



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Análisis de los componentes de las vías de NF κ B y algunos genes blanco
en la línea celular HaCaT**

T E S I S

Que presenta:

Norberto Iván Bautista Gaytán

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

En la especialidad en:

Biomedicina Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Asesores:

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Dr. Porfirio Nava Domínguez

México, Ciudad de México

Agosto de 2017

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 1 del departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, el autor contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

DEDICATORIA

A mis abuelos:

Norberto Bautista Gijón † y Constantino Gaytán Rodríguez †

Siempre les recordaré con respeto, cariño y admiración, agradezco el ejemplo, los valores y enseñanzas que me brindaron y que han formado la persona que soy.

A mi familia:

Mis padres: Julieta Gaytán y Víctor Bautista, porque siempre han creído en mí

Mi hermano: Erwin Bautista, el mejor hermano y amigo que se pudiera tener

Mis abuelas: Lilí De la Rosa † y Catalina Gaytán, por su cariño y paciencia

y especialmente a Alejandra Lira, por ser alguien muy importante en mi vida y acompañarme en esta etapa de mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, por su asesoría, por su paciencia y su incondicional apoyo.

A la Dra. Leticia Cedillo Barrón y el Dr. Porfirio Nava por su asesoría y tiempo empleado para la revisión de la presente tesis.

Al Biólogo Raúl Bonilla Moreno por el apoyo brindado en la fase experimental.

A mis compañeros del Laboratorio 1: M. en C. Israel Aguiar, M. en C. Carolina Vaisman y QBP. Remberto Conde, del departamento de Biomedicina Molecular por su compañía, amistad y apoyo.

Al C. Víctor Manuel Ortiz Santiago por su apoyo y ayuda técnica en el laboratorio.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
VÍA CANÓNICA DE NFκB	12
VÍA NO CANÓNICA DE NFκB	14
QUERATINOCITOS.....	16
PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LOS QUERATINOCITOS.....	20
CARACTERÍSTICAS DE LOS QUERATINOCITOS HUMANOS INMORTALIZADOS (HACAT) ...	21
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
METODOLOGÍA	26
CULTIVO CELULAR	26
WESTERN BLOT.....	28
RT-PCR	29
RESULTADOS.....	31
1)EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE NFκB EN HACAT.	31
2) EXPRESIÓN DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN EN HACAT (K5 Y K10).....	32
3) EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA VÍA CLÁSICA NFκB EN HACAT EN BAJA CONCENTRACIÓN DE CALCIO Y ALTA CONCENTRACIÓN DE CALCIO.	34

4) EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA VÍA ALTERNA $\text{NF}\kappa\text{B}$ EN HACAT EN BAJA Y ALTA CONCENTRACIÓN DE CALCIO.....	36
5) EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA VÍA CLÁSICA DE $\text{NF}\kappa\text{B}$ EN HACAT EN BAJA Y ALTA CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN PERIODOS CORTOS.	38
6) EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA VÍA ALTERNA DE $\text{NF}\kappa\text{B}$ EN HACAT EN BAJA Y ALTA CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN PERIODOS CORTOS.	39
7) EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES BLANCO REGULADOS POR $\text{NF}\kappa\text{B}$	40
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	47
PERSPECTIVAS.....	48
REFERENCIAS.....	49

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1.- VÍA DE SEÑALIZACIÓN CANÓNICA DE NFκB.....	13
FIGURA 2.- VÍA DE SEÑALIZACIÓN NO CANÓNICA DE NFκB EN ESTADO BASAL Y ACTIVO.....	15
FIGURA 3.- CORNIFICACIÓN Y APOPTOSIS EN QUERATINOCITOS.....	16
FIGURA 4.- ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE LAS VÍAS DE NFκB EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER CERVICO UTERINO.....	23
FIGURA 5.- EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES FUNCIONALES DE NFκB EN HACAT EN CONDICIONES BASALES. N: NÚCLEO, C: CITOPLASMA.....	32
FIGURA 6.- EXPRESIÓN DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN. A: (QUERATINA 5), B (QUERATINA 10) EN QUERATINOCITOS HACAT TRATADOS CON CaCl ₂ 0.03mM Y 2.8 mM.....	34
FIGURA 7.- ACTIVACIÓN DE LA VÍA CLÁSICA DE NFκB EN HACAT POSTERIOR A SUPLEMENTAR CON CALCIO 2.8mM A LAS 24 (T1), 72 (T2) Y 120 (T3). N: NÚCLEO, C: CITOPLASMA. QUERATINOCITOS CRECIDOS EN BAJO CALCIO=T0.....	36
FIGURA 8.- ACTIVACIÓN DE LA VÍA ALTERNA DE NFκB EN HACAT POSTERIOR A SUPLEMENTAR CON CALCIO 2.8mM A LAS 24 (T1), 72 (T2) Y 120 (T3). N: NÚCLEO, C: CITOPLASMA. QUERATINOCITOS CRECIDOS EN BAJO CALCIO=T0.....	37
FIGURA 9.- ACTIVACIÓN DE LA VÍA CLÁSICA DE NFκB EN HACAT POSTERIOR A SUPLEMENTAR CON CALCIO 2.8mM A LAS 3 (T1), 6 (T2) Y 9 (T3). N: NÚCLEO, C: CITOPLASMA. QUERATINOCITOS CRECIDOS EN BAJO CALCIO=T0.....	39
FIGURA 10.- ACTIVACIÓN DE LA VÍA ALTERNA DE NFκB EN HACAT POSTERIOR A SUPLEMENTAR CON CALCIO 2.8mM A LAS 3 (T1), 6 (T2) Y 9 (T3). N: NÚCLEO, C: CITOPLASMA. QUERATINOCITOS CRECIDOS EN BAJO CALCIO=T0.....	40
FIGURA 11.- EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR NFκB EN QUERATINOCITOS INMORTALIZADOS (HACAT) BAJO CONDICIONES BASALES, NO DIFERENCIADOS Y DIFERENCIADOS.....	41
TABLA 1.- CONDICIONES Y SECUENCIAS USADAS PARA LOS ENSAYOS DE PCR DE ALGUNOS GENES BLANCO REGULADOS POR NFκB.....	30

ABREVIATURAS

°C.- Grados centígrados

ARD.- Dominio de repetidos de ankirina

BAFFR.- Receptor del factor activador de células B

C terminal.- Carboxilo terminal

Ca.- Calcio

CaCl.- Cloruro de calcio

CaR.- Receptor de calcio

CD40L.- CD40 ligando

CD40R.- Receptor de CD40

cIAP1/2.- Proteína inhibidora de la apoptosis

CTD.- Dominio C terminal

DAG.- Diacilglicerol

DD.- Dominio de muerte

DMEM.- Medio Eagle modificado Dulbecco

FBS.- Suero Fetal Bovino

GAPDH.- Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

GM-CSF.- Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HaCaT.- Queratinocitos humanos inmortalizados

hnRNPA1.- Ribonucleoproteína heterogénea A1

ICAM.- Molécula de adhesión intercelular

IKK.- Cinasa de I κ B

IL1.- Interleucina 1

IL1R.- Receptor de Interleucina 1

INF.- Interferon

IP3.- Fosfatidil Inositol

I κ B.- Inhibidor de NF κ B

LT β R.- Receptor de linfotoxina beta

N terminal.- Amino terminal

nm.- nanómetros

NF κ B.- Factor nuclear κ B
NIK.- Cinasa inductora de NF κ B
NLS.- Señal de localización nuclear
NTD.- Dominio N terminal
PAMPs.- Patrones moleculares asociados a patógenos
pb.- pares de bases
PBS.- Buffer de fosfatos
PCR.- Reacción en cadena de la Polimerasa
PI3K.- Cinasa de fosfatidil 3 inositol
PID.- Dominio inhibitorio de procesamiento
PKC.- Proteína cinasa C
PLC.- Fosfolipasa C
RHR.- Región de homología Rel
RIP.- Proteína que interactúa con receptor
rpm.- Revoluciones por minuto
SILs.- Lesiones intraepiteliales escamosas
TAD.- Dominio de transactivación
TAE.- Tris. Ácido acético, EDTA
TAK.- Cinasa activada de TGF beta
TGF β .- Factor de crecimiento transformante beta
TLR.- Receptor tipo Toll
TNA alfa.- Factor de necrosis tumoral alfa
TNR1/2.- Receptor del factor de necrosis tumoral
TRADD.- Proteína con Dominio de muerte asociada al TNFR1
TRAF.- Factor asociado al TNFR
TRANCE R.- Receptor activador del factor nuclear κ B
VPH.- Papiloma virus humano
 μ g.- Microgramos
 μ l.- Microlitros

RESUMEN

El factor nuclear κ B, es un factor de transcripción que regula diversos procesos celulares, su alteración se relaciona con diversas patologías como el cáncer. Los queratinocitos son infectados y transformados por HPV provocando que se malignicen, llevando a la formación de tumores. Además, en nuestro grupo de trabajo se ha observado, activación diferencial del factor de transcripción NF κ B1 y NF κ B2 en líneas celulares derivadas de carcinoma cervical positivas y negativa HPV. Por ellos nos preguntamos, si esta activación diferencial de NF κ B se debe al fenotipo de malignidad adquirido por las células cancerosas, o si es debido al proceso de diferenciación que ocurre en los queratinocitos antes de la malignización, permitiendo que estos migren a través de los estratos para mantener la homeostasis en la epidermis. Para responder esta hipótesis, investigamos el estado de activación de NF κ B1 durante la diferenciación de los queratinocitos mediada por calcio, usando como modelo experimental la línea células HaCaT.

En el presente trabajo, se describe la participación de las vías clásica y alterna de NF κ B durante el proceso de diferenciación inducido con una alta concentración de calcio en la línea celular de queratinocitos inmortalizados, no oncogénico (HaCaT), como un modelo comparativo que no representa malignidad.

Los resultados sugieren que en este modelo, el incremento de calcio y por lo tanto el proceso de diferenciación, activa la vía clásica y alterna de NF κ B; esta activación incrementa cuando las células están diferenciadas; además, este proceso de activación de NF κ B ocurre desde periodos cortos. Es importante resaltar que las células que son similares a los queratinocitos no diferenciados pertenecientes al estrato basal, únicamente tienen activa la vía clásica como activador transcripcional y la alterna como represor. En condiciones basales, sin alterar las concentraciones de calcio, la vía clásica de NF κ B se encuentra activa y esto demuestra la importancia de ambas vías durante el proceso de diferenciación.

ABSTRACT

Nuclear factor κ B is a transcription factor that regulates several cellular processes; its alteration has been related with diverse pathologies, including cancer. Keratinocytes are infected and transformed by HPV and sometimes; they become malignant, forming tumors. Besides, our working group has been observed, differential activation of transcription factor NF κ B1 and NF κ B2 into negative and positive HPV cervical carcinoma derived cell lines. Thus we wonder, whether this differential NF κ B activation was due to the different malignant phenotypes acquired for cancer cells, or it was due to the differentiation process occurring in the keratinocyte cells, before their malignant transformation, allowing them to migrate through strata to maintain epidermis homeostasis. To aim answer the latter hypothesis, we were prompted to investigate the activation status of NF κ B1 during Calcium-mediate differentiation of the keratinocyte cells, by using as experimental model the HaCaT cell line.

In the present work we describe the participation of classical and alternative NF κ B pathways during the process of differentiation induced with high calcium concentration in a non-oncogenic immortalized keratinocyte cell line (HaCaT), as a comparative model that does not represent malignancy.

The results suggested that in this model, the increase of Calcium and therefore the differentiation process activate the classic and alternative NF κ B pathways; this activation increase when the cells are differentiated; in addition, this process of NF κ B activation occurs from short periods. It's important highlight that the cells similar to the undifferentiated keratinocytes belonging to the basal stratum, only activate the classical pathway as transcriptional activator and the alternative as repressor. In basal conditions, without altering the calcium concentrations the classic NF κ B pathway is active demonstrating the importance of both pathways during the differentiation process.

INTRODUCCIÓN

El factor de transcripción NF κ B fue descubierto en 1986, es un factor nuclear que se une al elemento *enhancer* de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina de linfocitos B activados (Baltimore, 1986). Este factor de transcripción regula la expresión de una gran variedad de genes involucrados en distintos procesos tales como inflamación, respuesta inmune, crecimiento celular y desarrollo, es activado en respuesta a varias señales tales como: citocinas, patógenos, daño y otras condiciones de estrés. El factor de transcripción NF κ B está compuesto por una familia de 5 proteínas diferentes: Rel A (p65) el cual da su nombre a la familia NF κ B, Rel B, c-Rel, p50 (cuyo precursor es p105) y p52 (cuyo precursor es p100), las cuales están estrictamente reguladas, debido a que la inapropiada activación de las vías de señalización de NF κ B esta ligada a varios tipos de cáncer, inflamación crónica y autoinmunidad (Basseres, 2006).

Todos los miembros de la familia NF κ B contienen un dominio de dimerización y unión a DNA altamente conservado, este dominio se conoce como región de homología Rel (RHR) y les permite formar homo o heterodímeros (Basseres, 2006). Rel A (p65), Rel B y c-Rel contienen el dominio de transactivación (TAD) en el carboxilo terminal que permite la activación de la expresión de genes blanco, las proteínas p105 y p100 presentan dominios que contienen repetidos de ankirina en el C terminal, no pueden activar genes blanco como homodímeros hasta ser activados proteolíticamente (p50 y p52) por el proteosoma. El dominio RHR de Rel A, Rel B y c-Rel contiene dos dominios conectados: el dominio N terminal (NTD) y el dominio C terminal (CTD) este contiene la señal de localización nuclear (NLS), los dominios CTD Y NTD rodean el DNA blanco promoviendo la interacción con una secuencia específica (Napestchnig, 2013). El procesamiento mediado por proteosoma de p105 y p100 no solo produce los componentes p50 y p52 respectivamente, además resulta en la interrupción de función I κ B-like de estos precursores (Sun, 2008).

La activación de la vía de señalización de NF κ B se inicia con un estímulo extracelular, el cual es producido por una variedad de receptores (TNFR, BAFFR, IL1R, TRANCE-R, entre otros) y trasmite la señal intracelularmente a proteínas adaptadoras que inician la cascada de señalización, la cual lleva a la activación de la cinasa de I κ B (IKK), que fosforila a I κ B y esta se degrada en el proteosoma permitiendo la translocación del dímero de NF κ B al núcleo (p50/p65) permitiéndose la transcripción de los genes blanco (Napestchnig, 2013), esta vía es considerada canónica o clásica.

La vía de señalización de NF κ B se divide en 2: vía canónica (clásica) y no canónica (alternativa), en cada una actúan diferentes proteínas efectoras y ambas culminan en la translocación al núcleo de homo y heterodímeros de P50 o P52 respectivamente, que se unen a secuencias de DNA blanco.

- Vía canónica de NF κ B

En la vía canónica de NF κ B (Figura 1), señales pro inflamatorias como citocinas (tales como TNF α , IL1 etc.), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) activan la cascada de señalización que lleva a la activación de diversos receptores de la super-familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y la de los receptores tipo Toll/receptor de interleucina 1 (TLR/IL-1R). Las cascadas de señalización que inician los receptores de TNF son diversas y pueden inducir la activación de la vía de NF κ B o apoptosis; durante la activación son reclutadas distintas proteínas al dominio intracelular de TNFR. Los factores asociados al receptor de TNF (TRAFs) son reclutados al receptor directamente o por medio de proteínas adaptadoras como la proteína adaptadora TRADD, a través de la interacción con su dominio de muerte (DD), al que se recluta TRAF2 (Banner, 1993). La región C terminal de TRAF facilita la trimerización y está involucrado en interacciones secuencia específica con el receptor TNF y proteínas adaptadoras, la región N terminal de TRAF contiene un dominio RING y en el caso de TRAF6 función de ubiquitina ligasa (E3) (Bianchi, 2009).

La región CC del trímero TRAF2 recluta proteínas inhibidoras de apoptosis (cIAP1/2), y los dominios RING de cIAP 1/2 poliubiquitinan proteínas blanco incluidas, RIP1 cinasa y NIK (Broemer, 2009). TRAF2 y cIAP forman el complejo E3 y son componentes esenciales en las vías de señalización canónica y no canónica de NFκB inducida por TNFα (Mahoney, 2008). La activación por TNFα, recluta al complejo TAK (cinasa activada de TGFβ) e IKK, al tallo intracelular de TNFR, en esta vía IKK es un complejo heterotrimérico compuesto de 2 subunidades catalíticas: IKKα e IKKβ y una subunidad reguladora (IKKγ) también llamada NEMO (Sun, 2008). El complejo IKK se encarga de mediar la liberación de IκB de los componentes de NFκB1 (p50 y p65) mediante la fosforilación de IκBα en 2 serinas (S32 y S36) del N terminal, promoviendo así su ubiquitinación y degradación en el proteosoma, subsecuentemente, los heterodímeros p50/p65 y p50/c-Rel, que son específicos de la vía canónica translocan al núcleo donde interactúan con secuencias específicas de DNA denominadas κB (Sun, 1993).

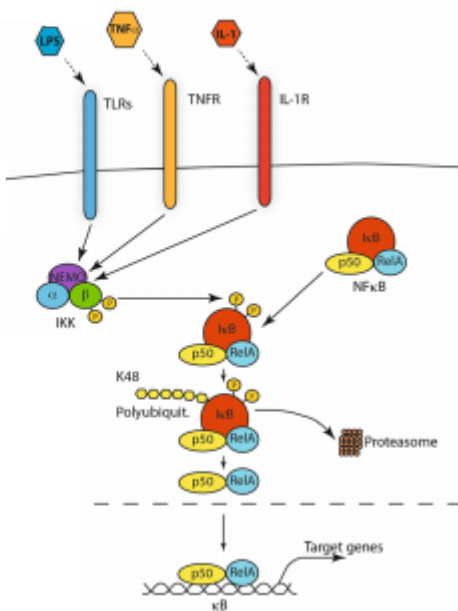


Figura 1.- Vía de señalización canónica de NFκB1 (Hoesel, 2013)

Vía no canónica de NFκB

La vía de señalización no canónica de NFκB (Figura 2) activa particularmente el complejo Rel B/p52, debido al procesamiento de p100 (NFκB2), este procesamiento es una señal de inducción y un evento post-traducciona, se ha sugerido que esta vía regula importantes funciones biológicas tales como organogénesis linfoides, maduración y supervivencia de células B, activación de células dendríticas (Dejardin, 2006). El procesamiento de p100 es inducido por la cinasa inductora de NFκB (NIK), (Xiao, 2001), esta cinasa se expresa constitutivamente, pero es constantemente degradada. La estabilización y acumulación de NIK es inducida por varios receptores, su actividad fosforila IKKα y a p100 culminando en la degradación parcial de p100 por el proteosoma. La región C terminal de p100, también es llamada dominio de respuesta a NIK, es esencial en el procesamiento de p100; esta región contiene 2 residuos de serina: s866 y s870 que son fosforilados por NIK, este evento es asociado con la ubiquitinación de p100 (Xiao, 2001) o NFκB2. En su porción C terminal contiene un dominio inhibitorio de procesamiento (PID), el cual enmascara la secuencia DD, también presenta un dominio de repetidos en ankirina (ARD), que enmascara la secuencia de localización nuclear, esto le confiere una función de supresión del procesamiento y es una manera de regulación, evitando así el procesamiento constitutivo de p100. (Xiao, 2001). Las funciones de NIK ocurren solo por la activación de IKKα; en la vía de señalización no canónica las subunidades IKKβ e IKKγ no son esenciales (Claudio, 2002).

En contraste a la vía canónica de NFκB que responde a señales de diversos receptores, la vía no canónica responde a un subconjunto específico de miembros de la familia de TNFR, tales como CD40, factor activador de células B (BAFFR), receptor β de linfotoxina (LTβR), receptor activador del factor nuclear κB (RANK), TNFR2, Fn14, (Sun, 2012). Cada uno de estos receptores es mediador de funciones biológicas específicas de la vía no canónica de NFκB, una característica común de los receptores que estimulan la vía NFκB no canónica es la posesión de motivos de unión a TRAF, estos reclutan diferentes miembros de TRAF,

particularmente TRAF 2 y TRAF 3 al complejo del receptor durante la unión del ligando. Este reclutamiento es importante para la inducción de NIK y el procesamiento de p100 (Bishop, 2007). La degradación de TRAF2 y TRAF 3 representa un paso importante en la activación de la vía no canónica de NF κ B (Sun, 2010), ya que la ubiquitinación de NIK es debido a un complejo ubiquitina ligasa compuesto por TRAF3, TRAF2 y cIAP1, este mantiene los niveles de NIK muy bajos constitutivamente. Por lo que deficiencias en este complejo lleva a la acumulación de NIK y procesamiento de p100, por lo tanto a un estado de activación constitutiva (Sun, 2012), con la consecuente translocación de los dímeros p52/Rel B, que mantienen la expresión de genes específicos de la vía alterna de NF κ B.

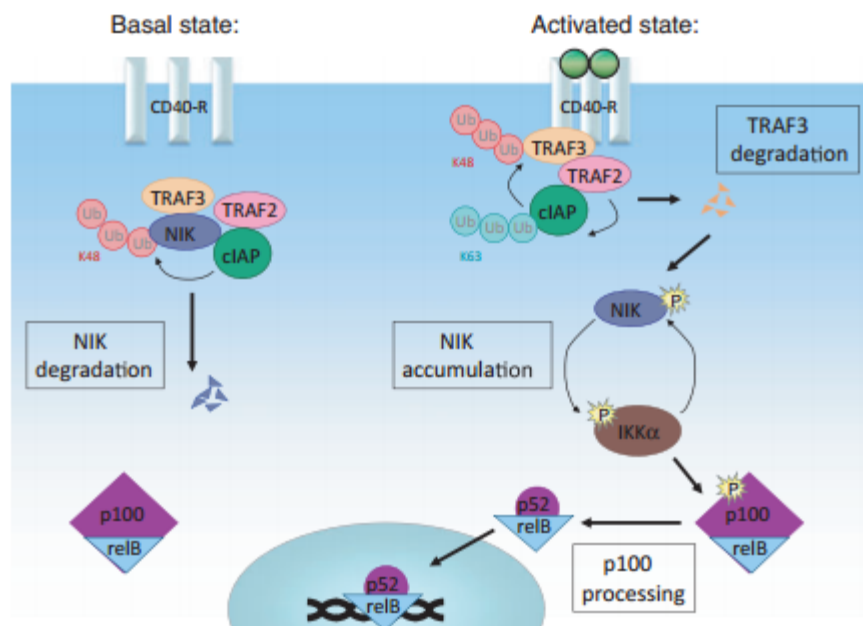


Figura 2.- Vía de señalización no canónica de NF κ B en estado basal y activo (Razani, 2011)

Queratinocitos

La epidermis es la capa externa de la piel que provee una barrera física y permeable, los queratinocitos son las células predominantes en la epidermis y continuamente se están regenerando, este proceso es conocido como cornificación (Steven, 1994). Los queratinocitos se mueven de un tipo celular proliferativo en el estrato basal de la epidermis (la apoptosis está restringida en este estrato) y terminan en la formación del estrato cornificado también conocida como stratum corneum (la cornificación ocurre en los estratos suprabasales) este proceso tiene como resultado la diferenciación de la epidermis (Reichert, 1993) (Figura 3). La proliferación, diferenciación y muerte celular ocurren secuencialmente, este proceso es caracterizado por la expresión de proteínas específicas (loricina, filagrina, involucrina, queratina entre otras). En la epidermis normal, el rango de proliferación en el estrato basal es balanceado con la descamación en el estrato cornificado, esta homeostasis constantemente regenera la epidermis (Lippens, 2005).

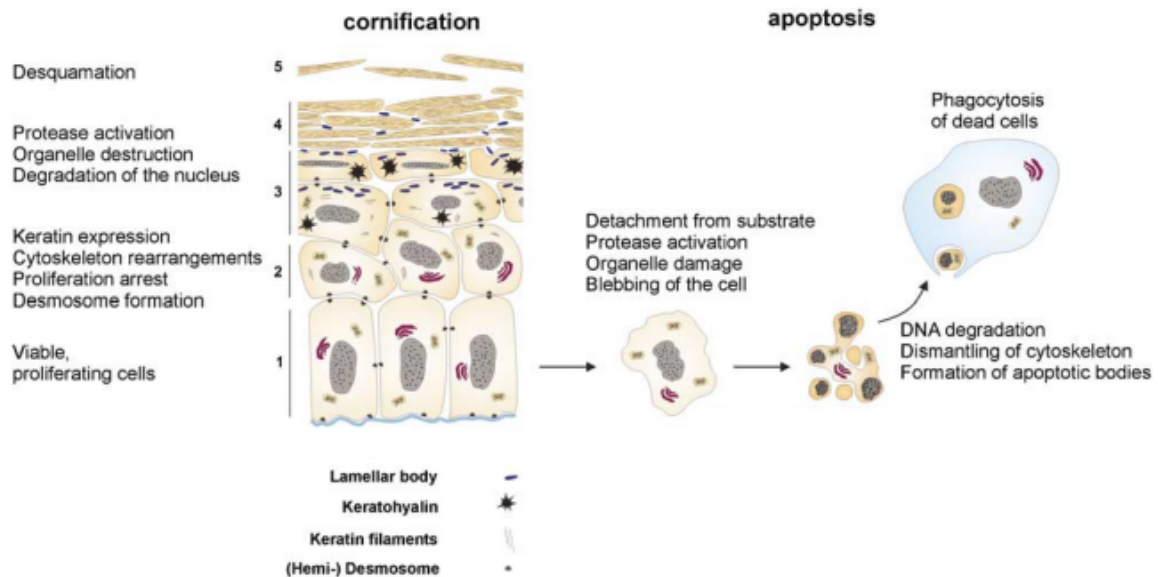


Figura 3.- Cornificación y apoptosis en queratinocitos. 1.- capa basal de la epidermis, queratinocitos no diferenciados 2.- capa espinosa donde inicia la

diferenciación 3.- capa granular, presencia de gránulos de queratohialina 4.- capa cornificada, células muertas 5.- células en descamación (Lippens, 2005)

Todos los componentes para apoptosis están presentes en los queratinocitos, este proceso ocurre principalmente en el estrato basal proliferativo, se ha demostrado que Bcl-xL, que esta normalmente localizado en las capas suprabasales y coopera con la vía anti apoptótica PI3K-Akt, para mejorar la sobrevivencia de queratinocitos posterior a la radiación UV (Umeda, 2003). En los queratinocitos, así como en otros tipos celulares, la expresión de la mayoría de genes de control de la apoptosis, está regulada a nivel transcripcional por diferentes factores de transcripción, tales como la familia de NF κ B, entre otros.

En piel de un modelo murino la subunidad p50 de NF κ B se encuentra en el citoplasma de queratinocitos basales, pero en los queratinocitos suprabasales que empiezan a ser mitóticamente quiescentes y comienzan a diferenciarse, la subunidad p50 está en el núcleo, eso sugiere que NF κ B participa en el switch de proliferación a arresto del crecimiento celular y diferenciación (Seitz, 1998). Mediante el bloqueo con inhibidores de NF κ B o con la mutante negativa de I κ Ba se desarrolla una marcada hiperplasia epidérmica. Esto demuestra el papel de NF κ B en la modulación del fenotipo de queratinocitos epidérmicos, también se ha demostrado que durante la pérdida de la regulación de la vía de NF κ B, los queratinocitos son más susceptibles a apoptosis inducida por TNF α , FasL o irradiación UV (Seitz, 1998), lo que remarca la importancia de esta vía para la supervivencia del queratinocito. Los antecedentes sugieren un papel de activación de NF κ B, por la vía canónica en la proliferación del queratinocito. Sin embargo, no es suficientemente claro el papel de cada una de las vías de activación de NF κ B, y por lo tanto de NF κ B1 o NF κ B2, en la proliferación, diferenciación y supervivencia del queratinocito.

En general, la activación de NF κ B resulta en protección contra apoptosis por la regulación positiva de genes antiapoptóticos tales como miembros de la familia Bcl-2 e inhibidores celulares de apoptosis (cIAPs), por lo tanto NF κ B ha

sido recientemente relacionado a diferentes tipos de cáncer humano; principalmente para proteger las células transformadas de la apoptosis (Greten, 2004).

En la epidermis, la expresión de proteínas anti apoptóticas dependientes de NF κ B como cIAP1 y 2, TRAF 1 y 2 esta incrementada en queratinocitos diferenciados (Chaturvedi, 1999). Todo esto sugiere un importante papel de NF κ B en la protección de queratinocitos contra la apoptosis cuando las células están llevando el proceso de diferenciación. En un modelo murino la deficiencia de IKK α es asociada con defectos en la diferenciación epidérmica y la formación de folículo capilar; sin embargo, esta desregulación es independiente de la vía de NF κ B (Hu, 1999). por lo que se atribuye un papel importante en la diferenciación a IKK α . La deficiencia de IKK β en la piel decremento el rango de proliferación de queratinocitos primarios y afecta la activación de NF κ B en respuesta a TNF o IL-1 β (Pasparakis, 2002). Los queratinocitos son capaces de expresar una gran variedad de proteínas de superficie celular, esta expresión puede ser regulada por una variedad de citocinas, incluidas INF γ , IL1 β y TNF α . CD40 es un miembro de la super-familia de TNF α que es expresado en varios tipos celulares, incluidos células B, células dendríticas, monocitos, células epiteliales endoteliales, neuronas y queratinocitos (especialmente en el estrato basal) el ligando de CD40 (CD40L) también conocido como CD154 o gp39, es primariamente expresando en células T activadas (Banchereau, 1994). En queratinocitos humanos, CD40L es expresado y tiene un papel funcional en la regulación de la expresión de ICAM1, Bcl-x y la secreción de IL8 (Denfeld, 1996). Se ha demostrado que CD40L inhibe la proliferación de queratinocitos e induce su diferenciación, sugiriendo un papel predominante de la vía de activación no canónica en la diferenciación del queratinocito y en los mecanismos de resistencia a la apoptosis. Además, la vía de señalización inducida por CD40L altera el ciclo celular en queratinocitos mediante un mecanismo independiente a apoptosis (Grousson, 2000), lo que fortalece la idea de esta diferencia funcional de las dos vías de activación de NF κ B.

Los queratinocitos son el blanco celular de infección de papiloma virus humano (VPH), el cual está asociado al desarrollo de cáncer cervical, los tipos de

VPH 16, 18 y 33 están fuertemente implicados como agentes causantes en la etiología del cáncer cervical y sus precursores designados lesiones intraepiteliales escamosas (SILs); aunque el virus por sí solo no es suficiente para el desarrollo de cáncer (Chen, 1993). La infección con VPH de los queratinocitos tiene influencia en la expresión de citocinas y quimiocinas, se ha demostrado que $TNF\alpha$ y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), son diferencialmente expresados en queratinocitos positivos a VPH (Mota, 1999), se ha descrito que el mecanismo responsable de esta producción alterada de citocinas en queratinocitos infectados con VPH, ocurre debido a interferencias en la vía de señalización de $NF\kappa B$ canónica.

En queratinocitos normales, se expresan los componentes funcionales de la vía canónica de $NF\kappa B$, su expresión es incrementada en queratinocitos transfectados con las oncoproteínas E6, E6/E7 de VPH 16, en las fracciones totales y citoplasmáticas. Sin embargo, la localización nuclear de los componentes funcionales está disminuida en queratinocitos transfectados con los oncogenes (Havard, 2002). En queratinocitos cervicales, se examinaron las alteraciones en la expresión de genes blanco de $NF\kappa B$, de respuesta a IFN y regulados por el ciclo celular causadas por las oncoproteínas E6 y E7 de HPV; la oncoproteína E6 estimula la expresión de genes inducidos por $NF\kappa B$, así como la expresión de componentes funcionales de esta vía tales como p50, NIK y proteínas que interactúan con TRAF (Nees, 2001). Sin embargo, algunos de los datos de la literatura parecen contradictorios (Nees, 2001 y Havard, 2002).

Recientemente en nuestro laboratorio se analizó la expresión de los factores de $NF\kappa B$ tanto canónicos como no canónicos en queratinocitos primarios obtenidos de prepucio, y en las líneas celulares C33A (línea de carcinoma de cérvix negativa a VPH), SiHa y CaSki (líneas positivas a VPH 16), en términos generales, la vía no canónica está muy activa en células de carcinoma cervical y la vía clásica parece activa, pero a muy bajos niveles, exceptuando a las células CaSki en las que las 2 vías parecen estar activadas en niveles similares; lo anterior se afirma debido a que se observa expresión de p52/Rel B y p50/Rel A o c Rel en sus extractos nucleares. En queratinocitos se observa expresión de p100

fosforilado lo que sugiere que la vía no canónica está activa, así como expresión de los componentes no activados de esta vía de NF κ B; sin embargo, desconocemos a profundidad el papel de cada una de las vías de activación en los mecanismos de proliferación, diferenciación y de resistencia a la apoptosis durante la diferenciación del queratinocito.

Proceso de diferenciación de los queratinocitos

En la epidermis, la proliferación está restringida al estrato basal, mientras que los estratos superiores llevan a cabo la diferenciación (Sun, 1976). Las queratinas (K) que se expresan principalmente en estrato basal son la 5 (K5) y la 14 (K14), en el estrato espinoso, la queratina K1 y K10, así como involucrina y transglutaminasa; mientras que loricrina y filagrina son producidos en el estrato granuloso (Elsholz, 2014), además este estrato sintetiza precursores esfingolipidos que son almacenados en cuerpos lamelares, estos se fusionan con las membranas durante la diferenciación y se incrustan en los corneocitos permitiendo que la barrera sea permeable (Proksch, 2008).

El principal desencadenante de la diferenciación es el calcio, esto fue demostrado en 1980 por Hennings; al elevar la concentración de calcio a 1.2 mM, se induce la diferenciación. Se han descrito 2 mecanismos de inducción de la diferenciación: genómicos y no genómicos, en el primero intervienen la formación de uniones intercelulares tales como los desmosomas y en el segundo la activación de genes de respuesta a calcio por ejemplo, la transcripción de los genes de involucrina y K1 (Bikle, 1996 y Huff, 1993). En diversos estudios, se ha confirmado la existencia de un gradiente de concentración de calcio en la epidermis, donde la concentración de calcio es mayor en los estratos suprabasales, comparados al estrato basal no diferenciado (Menon, 1991; Elias, 2002; Celli, 2010); por ello, el decremento en la concentración de calcio resulta en la reducción de marcadores de diferenciación tales como: involucrina, K1 o K10 (Elias, 2002).

El receptor de calcio (CaR) es importante para el proceso de diferenciación de los queratinocitos, debido a la señalización intracelular que promueve, mientras

que el calcio extracelular facilita la adhesión mediante la formación de desmosomas, uniones adherentes y uniones estrechas, el CaR promueve la formación de complejos E-cadherina/catenina en la membrana mediante RhoA y la familia de las cinasas Src, , lo que a su vez permite que se recluten enzimas importantes como la cinasa de fosfatidil 3 inositol PI3K, importante para la activación de fosfolipasa C gamma (PLC gamma), esta ultima produce 2 segundos mensajes importantes: fosfatidil 3 inositol (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 promueve el aumento de calcio intracelular activando su receptor en el retículo endoplásmico o Golgi liberando el calcio almacenado, en el citoplasma, este aumento prolongado de calcio intracelular acoplado a factores de transcripción y la Proteína cinasa C (PKC), regula la transcripción de genes necesarios para la diferenciación (Tu, 2011 y Popp, 2014), es decir, la producción *di novo* de todos los componentes expresados exclusivamente en los estratos suprabasales en la epidermis.

Características de los queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT)

HaCaT es una línea celular de queratinocitos inmortalizada; se obtuvo de un cultivo de queratinocitos de piel de humano adulto, crecida a una concentración de calcio reducida y a elevada temperatura (Boukamp,1988), la línea celular HaCaT posee mutaciones en ambos alelos del gen de p53, (Lehmann, 1993); las mutaciones son las típicas inducidas por radiación UV; p53 es un supresor de tumores que se induce en respuesta al daño del DNA en piel humana (Ziegler, 1993). Se ha propuesto que estas mutaciones provocan susceptibilidad a cambios citogenéticos. Otro mecanismo propuesto es el incremento de actividad de la telomerasa resultando en el mantenimiento de la longitud de los telómeros y es asociado a la inmortalización de células HaCaT (Harle-Bachor, 1996). Se han reportado 3 distintas translocaciones cromosomales que llevan a la pérdida de una copia de los brazos de los cromosomas 3p, 4p y 9p (Fusening, 1998). La pérdida del brazo corto del cromosoma 3p en particular puede explicar la pérdida de genes de senescencia causando inmortalización de la línea celular. Comparado con queratinocitos normales, las células HaCaT tienen la vía de señalización de NFκB

disfuncional para activación por INF γ combinado con esteres de forbol (TPA) y este defecto se asocia a que presenta alta susceptibilidad a apoptosis inducida por luz UV, sugiriendo que NF κ B es esencial en la adquisición de un fenotipo resistente a apoptosis en queratinocitos (Qin, 1999).

La vía de señalización de NF κ B es activada ante una gran variedad de estímulos, por lo que participa en una gran variedad de procesos y funciones celulares. En los antecedentes descritos se le ha dado únicamente importancia al análisis de los componentes funcionales de la vía canónica de NF κ B (p50, p65 y c-Rel) , también conocido como NF κ B1, en diferentes tipos celulares; sin embargo, recientemente la vía de señalización no canónica o alternativa, también conocida como NF κ B2, ha tomado relevancia por su relación en diversos tipos de cáncer, es importante estudiar ambas vías de señalización debido a que las 2 pueden estar activas en algunos procesos biológicos y en el cáncer, sobre todo, para conocer como participan c/u en funciones específicas, por ejemplo en los mecanismos de resistencia a la muerte programada por apoptosis y la diferenciación; así como determinar que genes están siendo activados en cada vía, para conocer el papel regulatorio que desempeñan dichas vías, en cada una de sus funciones celulares.

ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro grupo de investigación hemos encontrado que NF κ B está encendido diferencialmente por las dos vías de activación en cáncer cervico uterino (Figura 4), en las células menos resistentes a cisplatino (C33-A y SiHa) se encuentra activado preferentemente por la vía no canónica (NF κ B2), aunque su activación es menor en las células mas sensibles (C33-A); mientras que en las células mas resistentes al cisplatino (CaSki) se encuentra activado de manera similar, tanto la vía clásica (NF κ B1) como la alterna (NF κ B2). Debido a que C33-A proviene de un cáncer cervico uterino libre de HPV, nos preguntamos si la activación preferencial de NF κ B2, es debido a su origen celular queratinocítico, es decir, simplemente del estadio de diferenciación, quizás porque el queratinocito se

transformó o malignizó en un estrato de diferenciación, o si es algo inherente a la malignización.

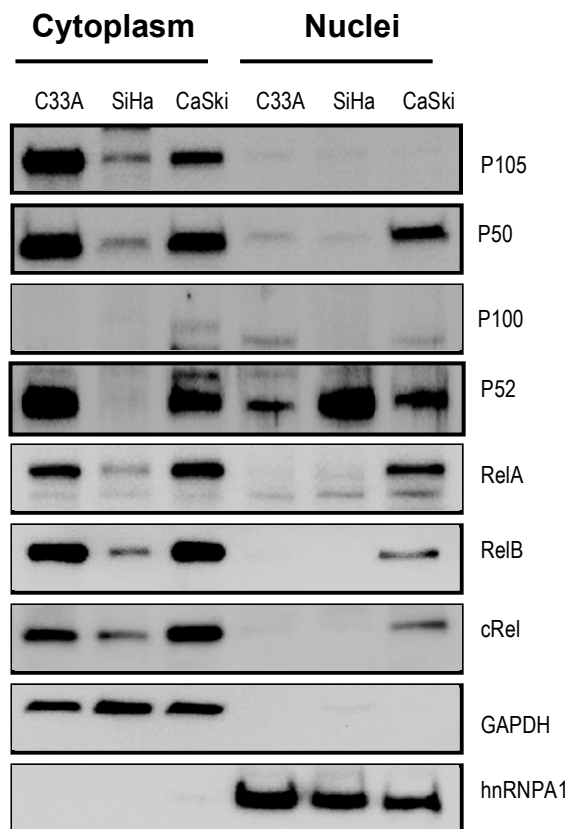


Figura 4.- Activación diferencial de las vías de NF κ B en líneas celulares de cáncer cervico uterino.

HIPÓTESIS

La vía de señalización de NF κ B participa diferencialmente en los procesos de proliferación y diferenciación del queratinocito.

Estos procesos son llevados a cabo por queratinocitos basales y suprabasales de la epidermis por lo que: los componentes de NF κ B deben estar expresados y activos de manera diferencial en las células del estrato basal y suprabasal.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de los diferentes componentes funcionales de la vía de señalización canónica y no canónica de NF κ B y su mecanismo de activación en una línea celular de queratinocitos inmortalizada (HaCaT) diferenciada con calcio y sin diferenciar.

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Analizar la expresión de los miembros de la familia de NF κ B en queratinocitos no diferenciados cultivados en medio bajo en calcio y en los diferenciados cultivados con alta concentración de calcio.

2) Determinar en qué funciones biológicas de los queratinocitos están participando las vías de NF κ B y determinar si son específicas de la vía canónica o de la vía no canónica.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos se propone la siguiente estrategia experimental:

- 1.- Obtención y cultivo de línea celular HaCaT en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), a partir de este cultivo realizar blot usando extractos de proteína solubles totales, citoplasmáticos y nucleares para analizar la expresión de los componentes de NF κ B y así establecer las condiciones basales; es decir, sin alterar la concentración de calcio.
- 2.- Crecimiento de células HaCaT a una concentración baja de calcio para mantenerlas en estado basal sin diferenciar y a una concentración alta de calcio para inducir la diferenciación, se usarán anticuerpos comerciales específicos para determinar si las células están diferenciadas (que expresen K10), o sin diferenciar (que expresen K5) posteriormente llevar a cabo extracción de proteínas solubles totales, citoplasmáticas y nucleares además de extracción de RNA.
- 3.- Análisis de expresión proteica de componentes de la vías de NF κ B en extractos solubles totales, nucleares y citoplasmáticos mediante Western blot usando anticuerpos comerciales específicos, contra los componentes funcionales de las vías de NF κ B; p65, p50, p52, Rel B y c-Rel.
- 4.- Análisis de la activación de genes blanco regulados por las vías de NF κ B mediante: RT-PCR usando diferentes oligos de genes blanco asociados a la vía que ya han sido descritos, tales como: MAD3, CD 40, HLA A, NF κ B1, NF κ B2, TNF alfa y Ciclina D1.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

Las células se crecieron en medio DMEM alto en glucosa, con L-Glutamina (Life Technologies) adicionado con suero fetal bovino (FBS) bajo en calcio, para remover el calcio endógeno del FBS, este fue tratado con un quelante (Chelex 100) adicionando 0.38g de quelante por cada 50 ml de FBS. Se usaron 2 concentraciones de calcio (0.03mM y 2.80mM), las cuales fueron adicionados al medio y así obtener 2 medios de crecimiento, uno con alta concentración de calcio (para inducir la diferenciación de queratinocitos) y el otro con baja concentración de calcio (para mantener los queratinocitos similares a los del estrato basal). El método de preparación de medios se describe a continuación: para 870 ml de DMEM se adicionaron 20 ml de L-glutamina 200 mM, 10 ml de solución de Cloruro de calcio (0.03 mM ó 2.80 mM) y 100 ml de FBS bajo en calcio, los componentes se mezclan suavemente y se filtraron (Millipore; 0.22 μ m de poro) en una botella estéril de 1L, con la finalidad de remover el quelante; posteriormente se almacenaron a 4°C.

Comúnmente, las células HaCaT son mantenidas en medio DMEM normal suplementado con FBS 10%, el cual contiene calcio suficiente para inducir la diferenciación, el paso de las células a un estado basal requiere crecimiento prolongado en medio con baja concentración de calcio, este proceso requiere de 3 a 4 semanas, manteniéndolas en cultivo a 37° y 5% de CO₂; no se debe permitir que el cultivo rebase mas del 80% de confluencia, ya que se puede inducir la diferenciación. Los queratinocitos diferenciados deben ser cultivados y mantenidos en medio con alta concentración de calcio a 37° y 5% de CO₂. La diferenciación fue confirmada con la expresión de marcadores tales como K10 e involucrina que aparecen entre 48 a 72 horas, para analizar la expresión de los marcadores de diferenciación se usaron ensayos de Western blot y anticuerpos comerciales específicos, y extractos proteicos de las células cultivadas en medio con alta y con baja concentración de calcio.

Una vez establecidos los cultivos de queratinocitos diferenciados y basales, cuando alcanzaron aproximadamente 80% de confluencia fueron utilizados para la extracción de proteína en extractos solubles totales, citoplasmáticos y nucleares. Brevemente, las células se cosecharon y se hicieron 2 lavados con PBS, subsecuentemente se adicionaron 700 μ l de Proteoject adicionado con Complete 1X (inhibidor de proteasas), se colocaron en agitador orbital (nivel 8) durante 10 minutos, el contenido de la caja fue recuperado con una espátula y se homogenizó con una pipeta, este se pasó a un tubo Eppendorf para centrifugar la muestra durante 20 minutos, 4° C a 12500 rpm, el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -70°C. La cuantificación de proteína se llevó a cabo mediante el método de Bradford, colocando 500 μ l de Bradford y 1 μ l de muestra en una celda, la muestra debe leerse a 590 nm en el espectrofotómetro.

Para la extracción de proteína nuclear y citoplásmica se siguieron las instrucciones del protocolo indicado en el kit NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo scientific 7883) para células adherentes. Las células se trataron con tripsina-EDTA, se resuspenden en 5 ml de PBS y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C, el pellet obtenido se resuspendió con PBS, posteriormente, se transfirió 1-10 $\times 10^6$ células a un tubo para micro centrifuga (1.5ml), la pastilla se obtiene por centrifugación a 2500 rpm, durante 5 min, el sobrenadante obtenido se descarta y se deja secar el pellet, se agrega CER I (1000 μ l) y se procede con la extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas, la muestra debe mezclarse en vortex durante 15 segundos para resuspender el pellet, se incuba durante 10 min en hielo, posteriormente se adiciona CER II (55 μ l) y se mezcla en vortex durante 5 segundos, se incuba durante 1 minuto en hielo, se vuelve a mezclar en vortex, para finalmente centrifugar la muestra a 12,000 rpm durante 15 min, inmediatamente el sobrenadante (extracto citoplasmático) es transferido a un tubo limpio, este fue almacenado a -80°C hasta su uso. El pellet obtenido de esta ultima centrifugación que contiene el extracto nuclear y se resuspendió en solución NER (200 μ l), la muestra se agitó en vortex durante 15 segundos y se colocó en hielo, cada 10 minutos se agitó en vortex por un total de 40 minutos, posteriormente fue centrifugado a 12,000 rpm

durante 15 minutos, y el sobrenadante obtenido (extracto nuclear) se transfirió a un tubo limpio y se almacenó a -80°C hasta su uso. Se realizó western blot utilizando anticuerpos comerciales específicos contra GAPDH y hnRNPA1 para corroborar la pureza de los extractos de citoplasma y núcleo, respectivamente.

Western blot

Una vez obtenidos los extractos solubles totales, nucleares y citoplasmáticos de las células HaCaT no diferenciadas y diferenciadas, se llevaron a cabo ensayos de Western blot para analizar la expresión de los diferentes componentes de la vías canónica y no canónica de $\text{NF}\kappa\text{B}$ así como los marcadores de diferenciación (K5 y K10) conforme a la siguiente metodología: se tomaron 50 μg de proteínas totales o 15 μg de proteínas citoplasmáticas y nucleares que fueron separadas por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% [4 ml de H_2O des ionizada, 2.5 ml de amortiguador Tris pH 8.8 1.5 M, 100 μl de SDS al 10%, 3.3 ml de mix de acrilamida 30% (29.2% de acrilamida y 0.8% de *N, N'*-metileno-bis-acrilamida), 100 μl de persulfato de amonio al 10% y 4 μl de TEMED].

Las proteínas se cargaron con el amortiguador de Laemmli y como marcador se utilizó el Bench Mark Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen). Las proteínas corrieron en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN II *Electrophoresis Cell* (Bio-Rad) con un amortiguador de corrida, posteriormente fueron transferidas en una membrana de PVDF utilizando un amortiguador de transferencia. Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS1X suplementada con 0.5% Tween-20 y 5% de leche descremada en polvo durante 1 hora, se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios (anti GAPDH 1:20000, anti hnRNPA1 1:250, anti p65 1:1000, anti p50 1:1000, anti p52 1:1000, anti Rel B 1:1000, anti c-Rel 1:1000, anti $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 1:1000, anti $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fosforilada 1:1000, anti NIK 1:1000, anti K5 1:500 y anti K10 1:10000). Como control de carga, se utilizó anti-actina (1:500) con las condiciones anteriores, posterior a la incubación del anticuerpo primario se llevaron a cabo 3 lavados durante 5 minutos cada uno con TBS1X, luego se incubaron con los

anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa correspondientes durante 1 hora y media en TBS1X-Tween-20. Se llevaron a cabo tres lavados durante 5 minutos con TBS1X-Tween-20 y se reveló por quimioluminiscencia con el substrato SuperSignal West Pico/Femto (Sigma Aldrich) utilizando el equipo ChemiDoc MP Imagen System (Bio-Rad).

RT-PCR

Para el análisis de la activación de genes blanco se realizó RT-PCR, para ello se llevo a cabo la extracción de RNA mediante el método de Trizol, a partir del cultivo celular con aproximadamente 80% de confluencia fue adicionado el reactivo y se hizo un raspado de la monocapa, posteriormente fueron agregados 200 μ l de cloroformo, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C; se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 500 μ l de isopropanol para precipitar el RNA, se centrifugó y la muestra se lavó con etanol al 70%, finalmente fue centrifugada a 12,000 rpm a 4°C durante 5 minutos y se resuspendió la muestra en 50 μ l de agua libre de nucleasas para ser almacenada a -70°C hasta su uso.

La integridad de RNA fue verificada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% con TBE1X. Para eliminar el DNA genómico remanente se realizó el tratamiento con DNAsas. Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción (RT), se usaron 10 μ g de RNA total de células HaCaT basales, no diferenciadas y diferenciadas, en una mezcla con 4 μ l de oligo dT 10 μ M, se incubaron a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente, se adiciona una mezcla con el amortiguador 5X, 4 μ l de Dithiothreitol 0.1 M, 4 μ l de dNTPs 200 μ M, 2 μ l de la retrotranscriptasa (200 U/ μ l) (SuperScript III, Invitrogen) y agua libre de nucleasas a un volumen final de 40 μ l. Se incubo la mezcla durante 10 minutos a 22°C y, después a 42°C durante 2 horas y finalmente a 70°C durante 15 minutos para la inactivación.

Se utilizó 1 μ l de cDNA como templado para la amplificación de los genes blanco de NF κ B y la mezcla de los siguientes reactivos: 5 μ l de amortiguador 10X, 2 μ l de MgCl₂ 50 mM, 4 μ l de dNTPs 200 μ M, 1 U de Taq DNA polimerasa (Gibco), 1 μ l de oligonucleótido sentido y 1 μ l de oligonucleótido antisentido, 10 μ M, y se llevo a un volumen final de 50 μ l con agua libre de nucleasas. La PCR se

llevó a cabo con las condiciones descritas en la Tabla 1. La reacción se lleva a cabo en el termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystem). Los productos de PCR se detectaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE1X y fueron visualizados en un trans-iluminador UV.

Transcrito	Forward	Reverse
GAPDH	5'-gacccttcattgacctcaac-3'	5'-gtggcagtgatggcatggact-3'
	92°:20seg. 45°:20seg. 72°:45seg. 25 ciclos	
Ciclina D1	5'-cacagatgtgaagttcattccaat-3'	5'-ggcttcgatctgctctggca-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	
MAD3	5'-cggactgtacagatcctggaag-3'	5'-cttcctacctccataaggctt-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	
TNF alfa	5'-caacctctctctgccatcaaga-3'	5'-agactcggcaaagtcgagatagtc-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 50 ciclos	
HLA	5'-ggagatcacactgacctggcag-3'	5'-cagctccagtgatcacagctc-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	
CD40R	5'-gtgctggtctttatcaaaaaggtg-3'	5'-cgactctcttggccatcctcct-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	
NFKB1	5'-gtggtcggcttcgcaaacct-3'	5'-cccctccagtcacacatcca-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	
NFKB2	5'-ggagctggagcaagaggccaaa-3'	5'-ggaagaaaccgaggctgcca-3'
	92°:20seg. 50°:20seg. 72°:45seg. 30 ciclos	

Tabla 1.- Condiciones y secuencias usadas para los ensayos de PCR de algunos genes blanco regulados por NFκB.

RESULTADOS

Expresión de componentes de NF κ B en HaCaT.

Para analizar la expresión de las componentes de NF κ B que se translocan al núcleo, se realizaron extractos nucleares y citoplasmáticos de queratinocitos inmortalizados (HaCaT) en condiciones basales; es decir, células que crecieron en medio sin modificar las condiciones de concentración de calcio, a partir de los extractos obtenidos se llevaron a cabo ensayos de Western blot usando como marcadores de localización nuclear y citoplasmática anticuerpos dirigidos a hnRNPA1 y GAPDH respectivamente y anticuerpos dirigidos a: p50 (p105), p52 (p100), c Rel, Rel A y Rel B.

En la figura 5 se observa que los extractos de proteína nuclear y citoplasmática, son apropiados para llevar a cabo los experimentos, ya que la expresión de los marcadores de citoplasma (GAPDH) y núcleo (hnRNPA1) no muestran contaminación importante. Todos los componentes de NF κ B se observaron expresados en citoplasma; sin embargo, únicamente p50, Rel A (p65) y en menor medida c Rel, presentaron localización nuclear, estas proteínas translocan al núcleo y por lo tanto se sugiere que la vía clásica de NF κ B se encuentra activa en células HaCaT en cultivo (condiciones basales). Cabe destacar que p100 y su forma procesada p52 están expresados en citoplasma en menor nivel con respecto a los componentes de la vía clásica de NF κ B, sugiriendo que los componentes de la vía alterna tienen poca participación en la regulación de procesos celulares llevados a cabo por HaCaT en condiciones estándar de cultivo.

La presencia de los componentes de la vía clásica de NF κ B en los extractos nucleares tanto de los que tienen el dominio TAD como la forma procesada de p105 (p50), indica que estos pueden estar translocando de citoplasma a núcleo como heterodímeros y así actuar como activadores transcripcionales; sin embargo, no es posible sugerir o afirmar que esto sea cierto, ni predecir que

genes están siendo activados para determinar que funciones biológicas están regulando.

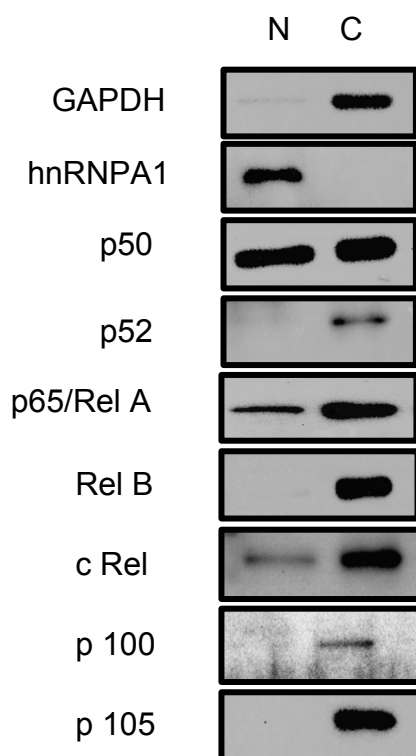


Figura 5.- Expresión de los componentes funcionales de NFκB en HaCaT en condiciones basales. N: Núcleo, C: Citoplasma.

2) Expresión de marcadores de diferenciación en HaCaT (K5 y K10)

Se obtuvieron queratinocitos similares a los del estrato basal y suprabasal (Wilson, 2012) usando 2 concentraciones de calcio (0.03mM y 2.8mM). K5 se expresa únicamente en queratinocitos pertenecientes al estrato basal por lo que se utilizó como un marcador para determinar la homogeneidad de la células de cultivo con bajo Ca⁺. Al analizar su expresión mediante Western blot en extractos de proteína soluble total, se observó que la línea celular HaCaT crecida en medio con baja concentración en calcio, se expresa la K5 (panel A de la figura 6); sin embargo, una vez que al medio se le aumentó la concentración en calcio a 2.8mM, su expresión se fue perdiendo. La detección de K5 se hizo a diferentes tiempos

(24, 72 y 120 horas) tomando en cuenta lo reportado en la literatura, ya que en presencia de 2.8mM de calcio, las células empiezan a diferenciarse de manera similar a lo que ocurre en células de estratos suprabasales. Cuando las células llevan 120 horas de crecimiento en medio con alta concentración en calcio se pierde la expresión de K5 y a su vez apareció una banda de menor peso molecular, la cual se sugiere que corresponde a K8, esta no ha sido reportada como marcador de queratinocitos pertenecientes a estratos suprabasales diferenciados. Por el contrario, también se observó que la expresión de K10 (Panel B de la figura 6) aumentó con el tiempo de cultivo, esta queratina es un marcador específico de estratos suprabasales, por lo que este dato sugiere que los queratinocitos comienzan a diferenciarse a estratos superiores.

Estos resultados sugieren que se obtuvieron las 2 poblaciones celulares, queratinocitos similares al estrato basal no diferenciado y queratinocitos similares a los de los estratos suprabasales (espinoso, granuloso y conificado), en proceso de diferenciación o ya diferenciados, por ello a estas células se les consideró viables para realizar nuevamente el fraccionamiento nuclear y citoplasmático y poder analizar los componentes de las vías clásica y alterna de NF κ B en estas 2 condiciones y determinar su papel en el proceso de diferenciación del queratinocito.

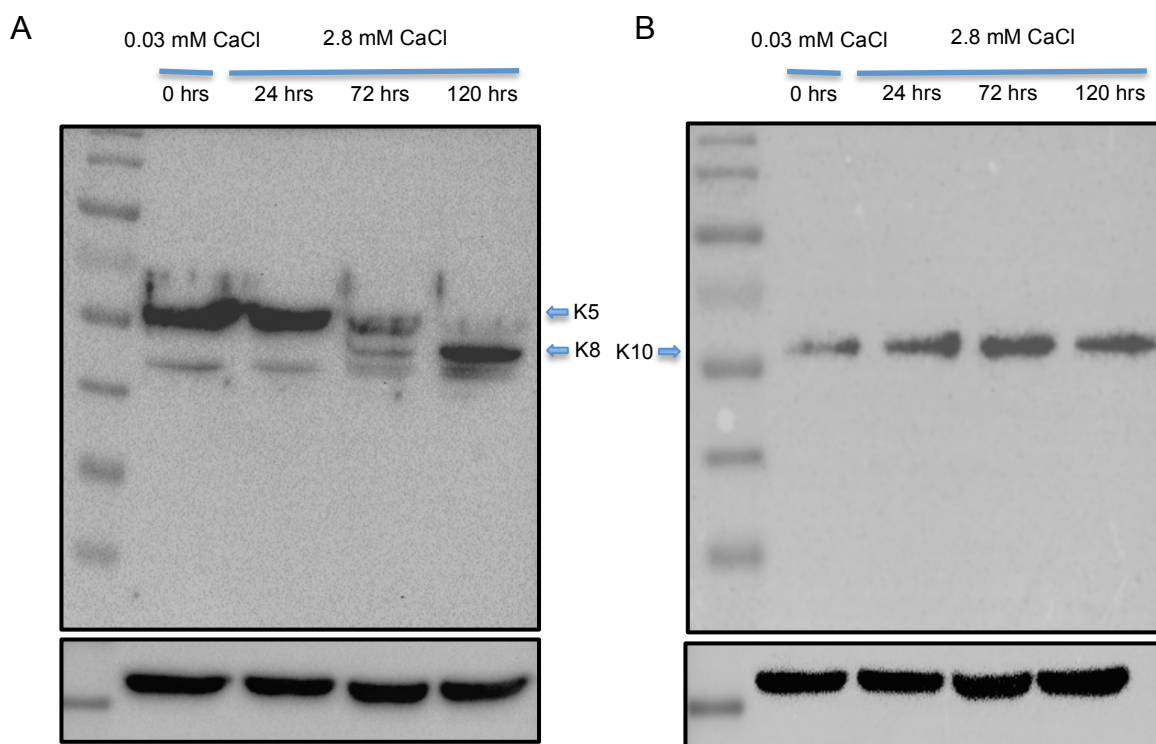


Figura 6.- Expresión de marcadores de diferenciación. A: (queratina 5), B (queratina 10) en queratinocitos HaCaT tratados con CaCl₂ 0.03mM y 2.8 mM.

3) Expresión de componentes de la vía clásica NFκB en HaCaT en baja concentración de calcio y alta concentración de calcio.

Se prepararon los extractos núcleo citoplasma a partir de células que crecieron en medio con baja concentración en calcio y se les denominó Tiempo cero (T₀), las cuales son células similares a los queratinocitos del estrato basal no diferenciados, posteriormente se suplementó el medio con calcio (2.8 mM) para inducir la diferenciación y se preparan los extractos nucleares y citoplasmáticos a 3 diferentes tiempos: 24 hrs (T₁), 72 hrs (T₂) y 120 hrs (T₃). Primero se llevaron a cabo ensayos de Western blot para analizar la expresión de los componentes de la vía clásica de NFκB (p50, p65 o Rel A, c Rel, p 105), como marcadores de localización nuclear/citoplasmática nuevamente fueron usados hnRNPA1 y GAPDH respectivamente y se uso actina como control de carga.

En la Figura 7 se observa que todos los componentes de la vía clásica de NF κ B se expresaron en citoplasma de queratinocitos que se mantuvieron en baja concentración de calcio, p50 forma procesada de p105 se observó en el extracto nuclear, también Rel (Rel A/ NF κ B / o p65) que contiene el dominio TAD, por lo que se sugiere que la vía clásica de NF κ B se encuentra activa en células HaCaT, respecto a c Rel la expresión nuclear es muy baja. En los queratinocitos diferenciados se observa nuevamente que p50, p65 y c Rel se expresaban en citoplasma a los diferentes tiempos de haberse suplementado el medio alto en calcio, además se detectaron en el núcleo, lo que sugiere la formación de heterodímeros, es importante señalar que esta expresión es mayor con respecto al T0 por lo que se sugiere que la activación de la vía clásica de NF κ B aumenta conforme los queratinocitos se diferencian, (al tiempo en que no expresan marcador del estrato basal), además el procesamiento de p105 (para generar p50) correlaciona con que su expresión es menor en T3. Se observó que la expresión de p50 tanto en núcleo como en citoplasma estaba aumentada, comparado con los demás tiempos, estos resultados indican que la vía clásica de NF κ B tiene un papel importante en el proceso de diferenciación; sin embargo, no sabemos si la activación es debida a la unión de un ligando al receptor (por ejemplo TNFR u otros) o en algún punto de la vía de señalización debido a efectos de cinasas activadas en otras vías de señalización.

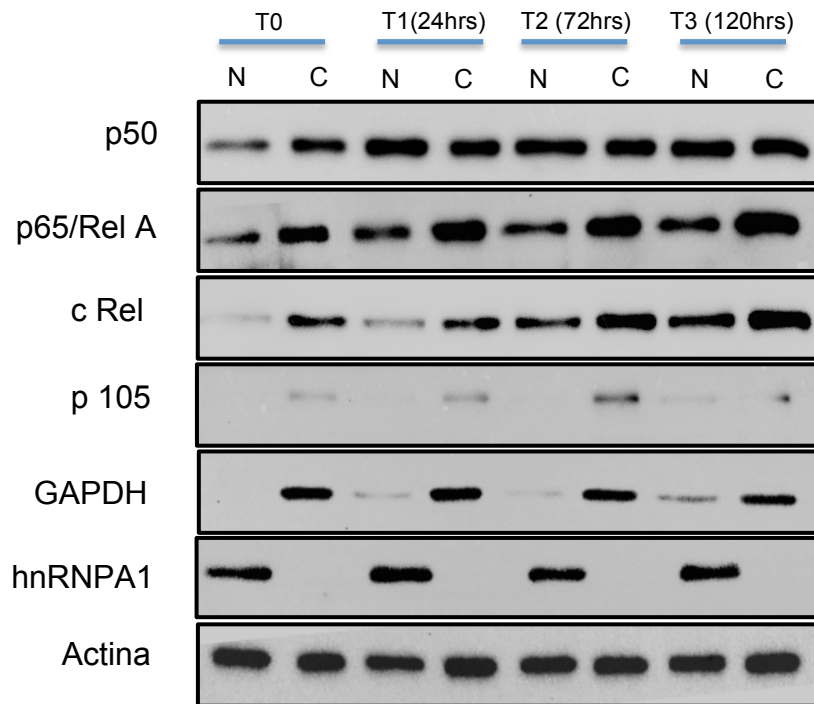


Figura 7.- Activación de la vía clásica de NFκB en HaCaT posterior a suplementar con calcio 2.8mM a las 24 (T1), 72 (T2) y 120 (T3). N: Núcleo, C: Citoplasma. Queratinocitos crecidos en bajo calcio=T0

4) Expresión de componentes de la vía alterna NFκB en HaCaT en baja y alta concentración de calcio.

Bajo las mismas condiciones, se analizó por western blot la expresión de los componentes de la vía alterna de NFκB (p52, Rel B y p100), en la Figura 8 se observó expresión nuclear de p52 en el T0, es decir, cuando los queratinocitos crecen a baja concentración de calcio y no están diferenciados, sin embargo, Rel B la proteína con la que forma heterodímeros no se detectó en el extracto nuclear, únicamente en citoplasma, por lo que se sugiere que en queratinocitos no diferenciados p52 posiblemente transloca al núcleo como homodímero, por lo que puede llevar a cabo funciones como represor transcripcional. Una vez que es suplementado el calcio para inducir el proceso de diferenciación, en los diferentes tiempos en los que se llevaron a cabo los experimentos se observa que p52 se

detectó en núcleo y su forma no procesada p100 únicamente en citoplasma, Rel B se detectó en núcleo y esta expresión aumenta conforme las células se mantienen en alta concentración de calcio, es decir, conforme se van diferenciando. Lo anterior sugiere que la vía alterna de NF κ B se activa durante el proceso de diferenciación de los queratinocitos, y posiblemente p52 transloca al núcleo como heterodímero con Rel B y así pueden actuar como factor de transcripción.

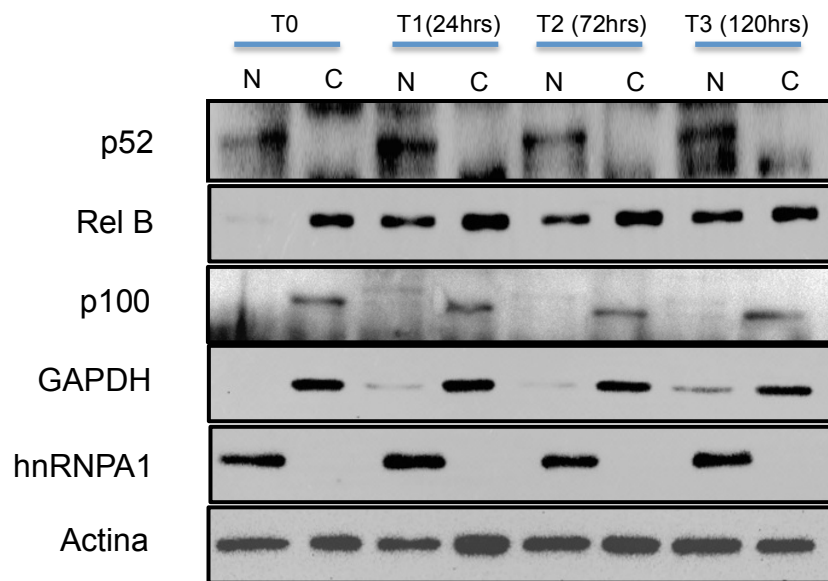


Figura 8.- Activación de la vía alterna de NF κ B en HaCaT posterior a suplementar con calcio 2.8mM a las 24 (T1), 72 (T2) y 120 (T3) horas. N: Núcleo, C: Citoplasma. Queratinocitos crecidos en bajo calcio=T0

5) Expresión de componentes de la vía clásica de NF κ B en HaCaT en baja y alta concentración de calcio en periodos cortos.

Se ha descrito, que dentro de las primeras 4 horas de haber suplementado a las células con medio alto en calcio, estas tienen cambios morfológicos y forman uniones estrechas (Wilson, 2007) y desmosomas (Hennings, 1983), esto interviene con el proceso de diferenciación que llevan a cabo los queratinocitos, es decir, que suplementar una concentración alta en calcio a la línea celular HaCaT tendría repercusión en el proceso de diferenciación a tiempos cortos y por ello se deben analizar los componentes de NF κ B en periodos mas cortos. Por esta razón fueron definidos 3 tiempos: T0 (queratinocitos mantenidos en baja concentración en calcio no diferenciados) y se prepararon los extractos núcleo/citoplasma a las 3 horas (T1), 6 horas (T2) y 9 horas (T3) de haber suplementado a las células con calcio (2.8 mM). Se analizó la expresión de los componentes de la vía clásica de NF κ B mediante Western blot. Nuevamente en los queratinocitos no diferenciados se encontró activa la vía clásica (Figura 9), una vez que se suplementa el calcio, la detección en núcleo de p50 y Rel A aumentó, así como el procesamiento de p105 que da lugar a p50, ya que la banda detectada disminuye su tamaño del T0 con respecto a los demás tiempos. Este hecho correlaciona con la detección de p50 aumentada en el núcleo, sugiriendo nuevamente que en tiempos cortos de suplementar, también la vía clásica de NF κ B se activa debido al aumento de concentración de calcio. Cabe destacar que el procesamiento de P105 y la translocación de heterodímeros de p50 -Rel A y -c Rel les permite actuar como activadores de la transcripción.

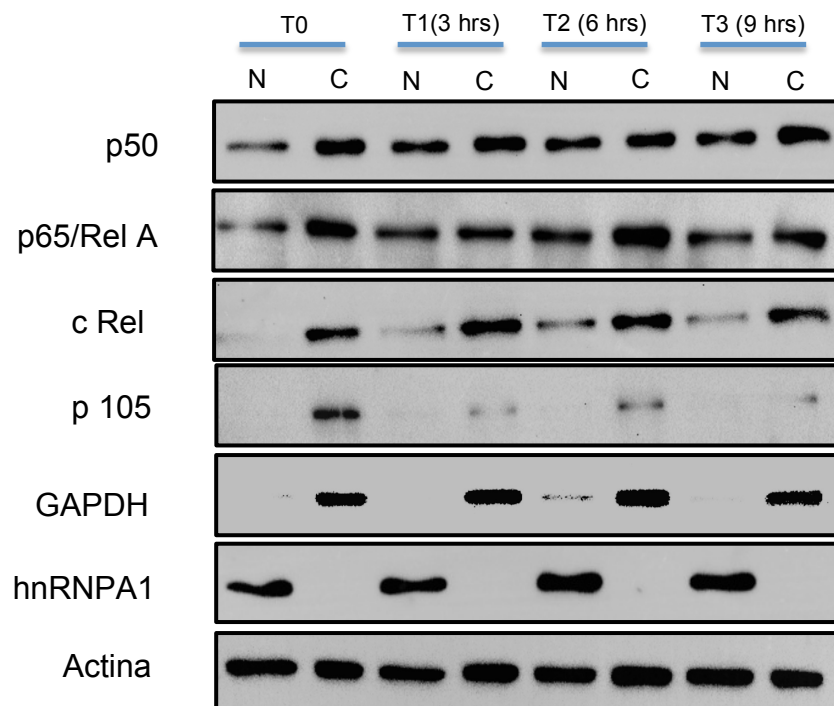


Figura 9.- Activación de la vía clásica de NFκB en HaCaT posterior a suplementar con calcio 2.8mM a las 3 (T1), 6 (T2) y 9 (T3). N: Núcleo, C: Citoplasma. Queratinocitos crecidos en bajo calcio=T0

6) Expresión de componentes de la vía alterna de NFκB en HaCaT en baja y alta concentración de calcio en periodos cortos.

Posteriormente se hicieron ensayos de western blot para analizar en esta ocasión los componentes de la vía alterna de NFκB en tiempos cortos posteriores a suplementar con alta concentración de calcio. En Figura 10 nuevamente se localizó p52 expresado en núcleo y posiblemente actuando como represor transcripcional en queratinocitos similares al estrato basal no diferenciado, esto correlaciona con la baja expresión de su forma no procesada p100 en citoplasma; sin embargo, esta expresión se va perdiendo posterior a suplementar con 2.8mM CaCl y la expresión de p100 aumentada evidenció que p52 no se estaba procesando, ni translocando al núcleo, por otro lado, la expresión citoplasmática de Rel B disminuyó debido a que pasa al núcleo y esta detección se mantiene,

sugiriéndonos activación diferencial de la vía alterna de NFκB que se lleva a cabo en horas posteriores al aumento del calcio.

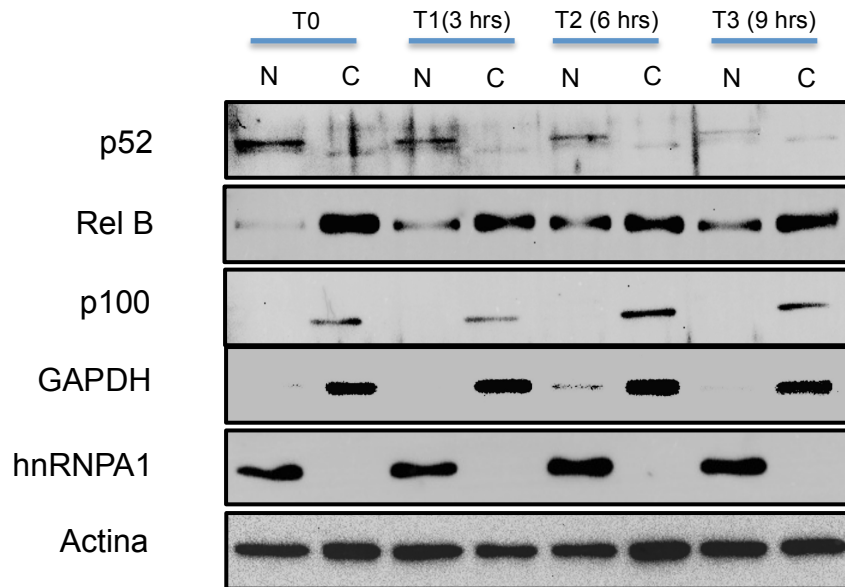


Figura 10.- Activación de la vía alterna de NFκB en HaCaT posterior a suplementar con calcio 2.8mM a las 3 (T1), 6 (T2) y 9 (T3). N: Núcleo, C: Citoplasma. Queratinocitos crecidos en bajo calcio=T0

7) Expresión de algunos genes blanco regulados por NFκB.

Para analizar la expresión de genes, previamente descritos, regulados por la vías clásica y alterna de NFκB, se realizaron extractos de RNA en 3 diferentes condiciones: Basales, es decir, células HaCaT que crecieron en DMEM sin modificaciones en la concentración de calcio, células similares a queratinocitos no diferenciados del estrato basal que crecieron en medio con baja concentración de calcio y los queratinocitos de estratos suprabasales diferenciados que se crecieron en medio alto en calcio; a partir de estos extractos se obtuvo cDNA y se llevó a cabo PCR para amplificar los oligos diseñados y específicos para cada gen elegido.

En la Figura 11 se observa que se detectó mayor expresión del gen de Ciclina D1 y TNFα en concentración baja en calcio, con respecto a la condición basal y diferenciada, esto correlaciona con que en esta población celular la vía

clásica de NF κ B se ha encontrado constitutivamente encendida, sin embargo, esta expresión no se puede asegurar que es debida al factor de transcripción p50/p65 o Rel A, por otro lado, el gen de HLA A que es regulado principalmente por Rel B componente de la vía alterna de NF κ B, se detectó expresado únicamente en queratinocitos diferenciados donde se encuentra activa la vía alterna; sin embargo, el gen del receptor de CD40R no se expresó en ni una de las condiciones, se uso CaSki línea celular proveniente de cáncer cervicouterino positiva a VPH16 como control positivo, en estas células se ha descrito expresión de CD40R. Los genes de NFKB1 y NFKB2 se expresaron en las 3 condiciones y estos a su vez son regulados tanto por la vía alterna como la clásica.

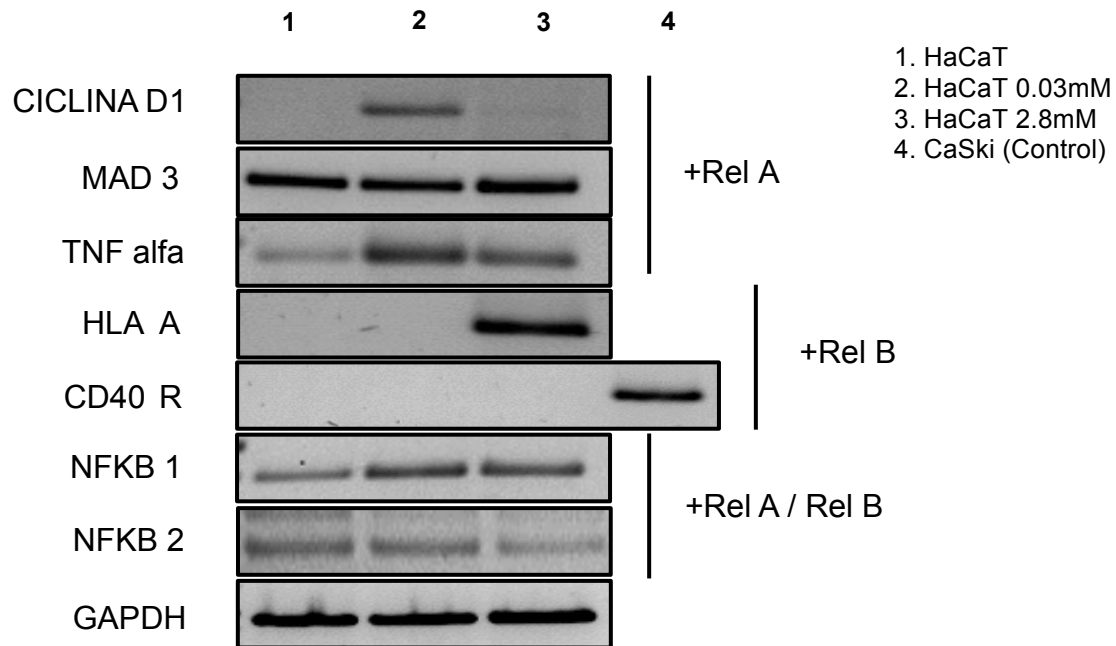


Figura 11.- Expresión de genes regulados por NF κ B en queratinocitos inmortalizados (HaCaT) bajo condiciones basales, no diferenciados y diferenciados

DISCUSIÓN

La familia del factor de transcripción NF κ B está involucrada en la regulación de distintos procesos celulares, algunos como diferenciación y resistencia a la apoptosis son importantes en los queratinocitos para llevar a cabo su equilibrio homeostático, de acuerdo a nuestros resultados los queratinocitos que conforman el estrato basal no diferenciado presentaron activa la vía clásica de NF κ B, la cual participa en el mecanismo de resistencia a la apoptosis (Barkett, 1999). Es posible que los mecanismos de resistencia a apoptosis en esta población celular tenga relación con el proceso diferenciación necesario para que estas células den lugar a los estratos suprabasales, ya que una función importante de la piel también es resistir los estímulos de agresión externa, incluyendo los de la Luz-UV. Por otro lado, la Ciclina D1 se expresa principalmente en células en proliferación y regula el ciclo celular, el gen de esta proteína, se detectó sólo en las células no diferenciadas que son proliferativas y pertenecen al estrato basal.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) es un ligando que se une al TNFR1 y da lugar a apoptosis o activación de la vía de NF κ B, el gen de TNF alfa también es expresado en células no diferenciadas: y es posible que participe en la activación de NF κ B observada en estas células. Aunque es factible que la activación se produzca debido a la unión de un ligando de la familia TNF, tal como TNF alfa y su receptor; sin embargo, no es posible asegurar esto con los datos obtenidos hasta este momento.

Analizar en un futuro el reclutamiento a TNFR1 de las proteínas adaptadoras TRADD y TRAF2, la subsecuente fosforilación del complejo IKK y degradación de la proteína I κ B, podría sugerir que la translocación de heterodímeros p50/Rel A se produce debido a un estímulo extracelular. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la activación de la vía de NF κ B no ocurre únicamente por estímulos extracelulares, por ejemplo, se ha descrito que I κ B es sustrato de Akt, (Meng, 2002) esta es activada con la cinasa de inositol 3 fosfato (PI3K), por ello se sugiere que NF κ B tiene interacción con otras vías de señalización; ya que la fosforilación de I κ B y su consecuente degradación libera

los heterodímeros p50/Rel B que pueden funcionar como activador transcripcional, estos factores que constituyen tales dímeros, son lo que fueron detectados en el núcleo de HaCaT, bajo condiciones basales y similares al estrato basal.

Comparando los resultados obtenidos, con los descritos por Havard en 2002, usando queratinocitos cervicales obtenidos a partir de biopsias de tejido sano que posteriormente fueron transfectados con las oncoproteínas E6 y E7 de HPV 16; ellos solo ven localización nuclear de p50 en queratinocitos normales, es decir, en su función de represor transcripcional. Sin embargo, nosotros observamos p50 y Rel A (p65), que juntos si forman heterodímeros actúan como activadores transcripcionales, pero en este proyecto se usaron queratinocitos inmortalizados que se obtuvieron a partir de piel, por lo que también es posible que algunos de los datos se deban a la transformación celular, o bien que las diferencias encontradas se deban a los diferentes orígenes de las poblaciones celulares. Ya que en ambas se encuentra activa la vía clásica de NF κ B, pero de una manera diferente.

Respecto a los resultados obtenidos en los queratinocitos a los que se indujo diferenciación aumentando la concentración de calcio, los resultados mostraron que, tanto la vía clásica como alterna parecen activas, ya que se detecto una mayor cantidad de p52, Rel B, p50, Rel A y c Rel en el núcleo que en el citoplasma. Se debe tomar en cuenta que el calcio es el principal inductor de la diferenciación en la epidermis, el aumento de la concentración de calcio en la epidermis promueve la formación de uniones intercelulares tales como uniones estrechas y desmosomas, estos a su vez proveen de fuerza mecánica y proporcionan señalización (Niessen, 2007) que produce la activación de factores de transcripción como AP1, que lleva a la activación de la transcripción del gen de involucrina (Bikle, 1996); la involucrina es una proteína que esta presente en los estratos suprabasales diferenciados. Es posible que el aumento en la activación en las vías de NF κ B observado en los tiempos largos de estimulación con calcio (de 24 hasta 120 horas) ocurra para incrementar el número de uniones intercelulares en los queratinocitos diferenciados, en nuestro caso queratinocitos similares a los de los estratos suprabasales.

Se ha descrito que posterior al aumento de calcio, se promueve el aumento de la formación de complejo cadherina/cateninas que son componentes de las uniones adherentes. La delección de E-cadherina daña el proceso de diferenciación de queratinocitos pero no la formación de uniones intercelulares como desmosomas o uniones estrechas (Tinkle, 2004), esto sugiere que estas tienen un papel importante para la diferenciación. Se ha descrito que la formación de estos complejos lleva a la activación de PI3K que a su vez activa tanto a la fosfolipasa C (PLC) que libera inositol tri fosfato para que se una a su receptor en el retículo endoplásmico aumentando así la liberación de calcio al citoplasma, por otro lado PI3K; como ya se mencionó también activa la cinasa Akt y esta fosforila IKK α (Shao, 2001) y probablemente regula I κ B, en experimentos realizados en el laboratorio se ha observado que I κ B se encuentra fosforilado, este estado puede ser debido tanto por la activación del heterotrímero IKK como por este mecanismo señalado. Se puede sugerir que la activación de la vía clásica de NF κ B observada en el modelo de diferenciación puede ser debida a una activación atípica, es decir, no necesariamente a la unión de un ligando al receptor de la familia TNFR. Por otro lado, la falta de expresión del gen de CD40R, en los queratinocitos aunque si se observa en el control positivo CaSki (célula tumoral), en donde tanto la vía alterna como la clásica se han encontrado activas. Sin embargo, tampoco se han explorado otros receptores que activan esta vía. Además, primero deberíamos examinar si la activación es dependiente o no de NIK. No se descarta la idea de que también la activación y participación de NF κ B2 en el proceso de diferenciación puede ser atípica, se sabe que es necesaria la acumulación de NIK mediante el reclutamiento del heterotrímero que lo regula negativamente. Karin M en el 2000 propone que la cinasa IKK α que es fosforilada y activada por NIK, también se activa via Akt. Una pregunta válida es: si la fosforilación de IKK α vía Akt u otras cinasas, también dan lugar al procesamiento parcial de p100.

Por otro lado, se sabe que IKK α es crucial para el proceso de diferenciación en la epidermis, ya que en ausencia de esta no hay formación del estrato granuloso ni cornificado, el modelo de activación que propone es mediante la formación de un complejo de IKK α con Smad2/3 que transloca al núcleo debido

a la activación del factor de crecimiento transformante beta (TGF beta) (Descargues, 2008). Dado este antecedente de la importancia de IKK α en el proceso de diferenciación, es posible que además de la formación de este complejo con Smad2/3, se produzca activación de IKK α en los queratinocitos de los estratos suprabasales y se lleve a cabo el procesamiento de p100 a p52 y por lo tanto activación de la vía alterna de NF κ B.

Por otro lado se ha descrito que Ro52, la cual es una proteína con función de ubiquitina ligasa, se encarga de regular negativamente a IKK beta y por lo tanto la vía clásica de NF κ B (Wada, 2009), en el laboratorio se detectó expresión de Ro52 en HaCaT en las 3 poblaciones estudiadas en este proyecto (basales, diferenciadas y no diferenciadas); por ello se sugiere una regulación indirecta de IKK α que a su vez tenga repercusión en la activación de NF κ B2 observada en los resultados.

Respecto a los antecedentes descritos en el laboratorio acerca de la activación diferencial de las 2 vías de NF κ B en las líneas celulares: C33A, SiHa y CaSki, esta última parece tener activas de manera similar ambas vías, CaSki proviene de un tumor que hizo metástasis además de tener mayor número de copias del VPH16. También es importante señalar que aunque todas estas células de carcinoma cervical han presentado activa la vía alterna de NF κ B, no se ha detectado la expresión de NIK, lo anterior sugiere activación por una vía atípica. Los datos anteriores nos llevan a la pregunta si este tipo de activación es algo adquirido debido a la malignización que representan estas líneas celulares y que los lleven a una alta proliferación y resistencia a la muerte para la formación de un tumor o si esta activación es debido al proceso de diferenciación que llevan a cabo los queratinocitos. Además, esto podría sugerir el estrato en el que pudieron originarse estos tumores, es decir, que el queratinocito en un estadio de diferenciación comenzó a proliferar y adquirió el fenotipo de malignidad.

También cabe destacar que en experimentos hechos en el laboratorio, mediante Western blot, en la línea celular CaSki se ha detectado baja expresión de K5 el cual es un marcador de queratinocitos pertenecientes al estrato basal no diferenciado, este puede apoyar que el origen del tumor del que deriva la línea

celular se dio en queratinocitos que iniciaron su diferenciación o pertenecientes a los estratos suprabasales.

Tomando en cuentas nuestros datos, si comparamos los resultados obtenidos en condiciones basales, es decir, sin alterar las concentraciones de calcio en donde únicamente se encontró activa la vía clásica de NF κ B se puede asegurar que la activación posterior de NF κ B2, al suplementar el cultivo con calcio, se debe únicamente a la presencia del calcio que lleva a cabo la activación atípica que se desata a partir de la señalización promovida por factores revisados anteriormente.

Ahora toca comparar las condiciones basales con las líneas celulares provenientes de cáncer tanto positivas como negativas a HPV16 (C33A HPV-, SiHa HPV+ y CasKi HPV+) en donde predomina la forma nuclear de p52, es decir, activación de la vía alterna y en CasKi donde ambas se detectaron activas, se puede sugerir que esta activación se observa también en células malignas. En HaCaT que a pesar de ser una línea celular transformada, con mutaciones en el gen de p53 y translocaciones en los cromosomas, no es oncogénica y no se encontró activa la vía alterna de NF κ B, salvo cuando recibe el estímulo que la lleva a diferenciarse.

Mas adelante se deberá investigar si la activación de las vías de NF κ B en HaCaT como en las líneas celulares provenientes de cáncer se disparan por diferentes estímulos, como citosinas expresadas por el queratinocito (HaCaT) o las células tumorales, o bien por la presencia del HPV, para después compararlas con respecto a un epitelio estratificado sano que mantiene su equilibrio homeostático. Además, en el cáncer, la activación de NF κ B2, puede estarse incrementando la producción o fomentando el mantenimiento de proteínas anti apoptóticas (reguladas por NF κ B) tales como las cIAPs adquiriendo así las células un fenotipo de resistencia a la apoptosis. Sin embargo, no se puede descartar que NF κ B2 puede ser inducida por otros estímulos externos, por ejemplo el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) (Guicciardi, 2010).

CONCLUSIONES

1.- En queratinocitos inmortalizados (HaCaT) en condiciones basales, similares a los del estrato basal no diferenciados, la vía clásica de NF κ B se encontró encendida.

2.- En queratinocitos inmortalizados diferenciados (después de 24 hasta 120 horas del estímulo de calcio), las vías clásica y alterna de NF κ B coexisten, ambas se encontraron activas y esto es relacionado al proceso de diferenciación llevado a cabo por el incremento de la concentración de calcio.

3.- El nivel de los componentes de la vía clásica de NF κ B en el núcleo aumentaron con el tiempo, cuando las células crecen en concentración alta de calcio.

4.- La activación de las vías de NF κ B se inició desde periodos cortos (de 3 a 9 horas) y se observaron diferencias en la activación con respecto a los periodos prolongados, lo que sugiere un temporalidad diferencial de los factores de esta familia de factores de transcripción.

5.- La expresión de algunos genes regulados por las vías clásica o alterna de NF κ B correlaciona con la activación de estas vías en las poblaciones celulares estudiadas.

PERSPECTIVAS

1.- Analizar los componentes encargados de la activación de NF κ B tanto en la vía clásica como en la alterna, además mediante inmunoprecipitación ver si hay reclutamiento de las proteínas que se activan río arriba de las vías o si la activación es debida al crosstalk con otras vías de señalización.

2.- Transfectar la línea celular HaCaT con las oncoproteínas E6 y E7 de VPH16 y determinar si la presencia de estas afecta la activación de las vías de NF κ B.

3.- Analizar mas genes blanco que son regulados por NF κ B y además la producción de diferentes citocinas en la línea celular HaCaT en condiciones basales, sin diferenciar y diferenciadas para compararlo con las líneas celulares provenientes de tumores positivas y negativas a VPH.

REFERENCIAS

- 1.- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, and Saeland S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*; 12:881.
- 2.- Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, et al. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kD TNF receptor-human TNF β complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*; 73(3): 431-445.
- 3.- Barkett M, Gilmore T. (1999). Control of apoptosis by rel/Nf κ B transcription factors. *Oncogene*; (18): 6910-6924.
- 4.- Basseres DS, Baldwin AS. Nuclear factor κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. (2006). *Oncogene*; 25(51): 6817-6830.
- 5.- Bianchi K, Meier P. (2009). A tangled web of ubiquitin chains. Breaking news in TNFR1 signaling. *Mol Cell*; 36(5): 736-742.
- 6.- Bishop GA, Xie P. (2007). Multiple roles of TRAF3 signaling in lymphocyte function. *Immunol Res*; 39: 22-32.
- 7.- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*; 106:761-771.
- 8.- Broemer M, Meier P. (2009). Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol*; 19(3): 130-140.
- 9.- Celli A, Sanchez S, Behne M, Hazlett T, Gratton E, Mauro T. (2010). The epidermal Ca²⁺ gradient: measurement using the phasor representation of fluorescent lifetime imaging. *Biophys J*; 98: 911-21.
- 10.- Chaturvedi V, Qin JZ, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, and Nickoloff BJ. (1999). Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J Biol. Chem*; 274: 23358- 23367.
- 11.- Chen TM, Pecoraro G and Defendi V. (1993). Genetic analysis of in vitro progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells. *Cancer Res*; 53, 1167-1171.

- 12.- Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. (2002). BAFF induced NEMO-independent processing of NF-kappaB2 in maturing B cells. *Nat immunol*; 17: 525-535.
- 13.- DeJardin M. (2006). The alternative NF-kappa B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol*; 72:1161- 1179.
- 14.- Denfeld R, Hollenbaugh D, Fehrenbach A, Weiss J, Leoprechting A, Mail B, Voith U, Schopf E, Aruffo A. and Simon J. (1996). CD40 is functionally expressed on human keratinocytes. *Eur. J Immunol* 26; 2329-2334.
- 15.- Descargues P, Sil A K, San, Y, Korchynskiy O, Han G, Owens, , Karin M. (2008). IKK α is a critical coregulator of a Smad4-independent TGF β -Smad2/3 signaling pathway that controls keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105(7), 2487-2492.
- 16.- Elias P, Ahn S, Brown B, Crumrine D, Feingold KR. (2002). Origin of the epidermal calcium gradient: regulation by barrier status and role of active vs passive mechanisms. *J Invest Dermatol*; 119: 1269-74.
- 17.- Elias PM, Ahn SK, Denda M. (2002). Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol*; 119: 1128-36.
- 18.- Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K. (2014). Calcium- a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur J Dermatol*; 24(6): 650-661.
- 19.- Fusenig NE, Boukamp P. (1998). Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog*; 23:144-58.
- 20.- Greten FR and Karin M. (2004). The IKK/NF-kappaB activation pathway- a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*; 206: 193-199.
- 21.- Grousson J, Ffrench M, Concha M, Schmitt D, Navarro-Peguet J. (2000). CD40 ligation alters the cell cycle of differentiating keratinocytes. *The J of inv Derm*; 114 (3): 581-586.
- 22.- Guicciardi ME, Mott JL, Bronk SF, Kurita S, Fingas CD, Gores GJ. (2010).

Cellular inhibitor of apoptosis 1 (cIAP-1) degradation by caspase 8 during TNF related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis. *Exp Cell Res*; 1:317(1): 107-116.

23.- Harle-Bachor C, Boukamp P. (1996). Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:6476-81.

24.- Havard L, Delvenne P, Frare J, Boniver J, Giannini SL. (2002). Differential production of cytokines and activation of NF κ B in HPV-Transformed keratinocytes. *Virology*; 298: 271-285.

25.- Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*; 19: 245-54.

26.- Hennings H, and Holbrook K. (1983). Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. *Exp Cell Res*; 143:127-142.

27.- Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R and Karin M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK alpha subunit of I κ B kinase. *Science*; 284: 316-320.

28.- Huff CA, Yuspa SH, Rosenthal D. (1993). Identification of control elements 3' to the human keratin 1 gene that regulate cell type and differentiation-specific expression. *J Biol Chem*; 268: 377-84.

29.- Karin M, Delhase M. (2000). The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: Key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol*; 12 (1): 85-98.

30.- Lehmann TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, Metcalf RA, Stampfer MR, Fusenig NE, Rogan EM, Harris CC. (1993): p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*; 14:833-839.

31.- Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenebeebe P, Declercq W. (2005). Death penalty for keratinocytes; apoptosis versus cornification. *Cell death and diff*; 12, 1497-1508.

32.- Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Planchette S, Simard C, et al. Both cIAP1 and cIAP 2 regulate TNF α - mediated NF κ B activation. (2008). *Proc Natl Acad Sci USA*; 105(33): 11778-11783.

- 33.- Meng F, Liu L, Chin PC, D’Mello SR. (2002). Akt is a downstream target of NF-kappa B. *J Biol Chem*; 277(33) 29674-29680.
- 34.- Menon GK, Elias PM. (1991). Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis. *Arch Dermatol*; 127: 57- 63.
- 35.- Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, and Chain B. (1999). The antigen presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV) related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol*; 116, 33-40.
- 36.- Napestchnig J, Wu H. (2013). Molecular basis of NFkB signaling. *Annu Rev Biophys*; 42: 443- 468.
- 37.- Nees M, Geoghegan J, Tehila H, Frank S, Miller L, Woodworth C. (2001). Papillomavirus Type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NFκB responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol*; 9: 4283-4296.
- 38.- Ng DC, Su MJ, Kim R, Bikle DD. (1996). Regulation of involucrin gene expression by calcium in normal human keratinocytes. *Front Biosci*; 1: a16-24.
- 39.- Niessen CM. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*; 127(11), 2525–2532.
- 40.- Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt-Supprian M, Nenci A, Toksoy A, Krampert M, Goebeler M, Giltz R, Israel A, Krieg T, Rajewsky K and Haase I. (2002). TNF mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature*; 417: 861-866.
- 41.- Popp T, Steinritz D, Breit A. (2014). Wnt5a/catenin signaling drives calcium-induced differentiation of human primary keratinocytes. *J Invest Dermatol*; 134: 2183-91
- 42.- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*; 17: 1063-72.
- 43.- Quin JZ, Chaturvedi V, Denning M, Choubey D, Diaz M, Nickoloff B. (1999). Role of NFκB in the apoptotic resistant phenotype of keratinocytes. *Journal Biol Chem*; 274:53: 37957-37964.
- 44.- Razani B, Reichardt A and Cheng G. (2011). Non canonical NFκB signaling activation and regulation: principles and perspectives. *Immun Rev*; 244: 44-54.

- 45.- Reichert U, Michel S, Schmidt R. (1993). The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes. (eds Darmon M, and Blumenberg M) Academic Press.London.
- 46.- Seitz CS, Lin Q, Deng H, Khavari PA. (1998). Alteration in NF-kappaB function in transgenic epitelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. Proc Natl Acad; 5:2307-2312.
- 47.- Sen Baltimore D. (1998). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell; 46: 705-716.
- 48.- Shao, R., Tsai, E. M., Wei, K., von Lindern, R., Chen, Y. H., Makino, K., & Hung, M. C. (2001). E1A inhibition of radiation-induced NF-kB activity through suppression of IKK activity and Ikb degradation, independent of Akt activation. Cancer res; 61(20), 7413-7416.
- 49.- Steven AC and Steinert PM. (1994). Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. J Cell Sci; 107, 693-700.
- 50.- Sun SC, Ganchi PA, Beraud C. Ballard, DW, Greene WC. (1993). NFkB controls the expression of inhibitor Ikb α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. Science; 259: 1912-1915.
- 51.- Sun SC, Ley SC. (2008). New insights into NF-kappa B regulation and function. Trends immun; 29: 469-478.
- 52.- Sun SC. (2010). Controlling the fate of NIK: a central stage in non canonical NF-kappaB signaling. Sci signal; 3: 18.
- 53.- Sun SC. (2011). Non canonical NFkB signaling pathway. Cell res; 21; 71-85.
- 54.- Sun TT, Green H. (1976). Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. Cell; 9: 511-21.
- 55.- Tinkle CL, Lechler T, Pasolli HA, Fuchs E. (2004). Conditional targeting of E cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses. Proc Natl Acad Sci USA; 101: 552-557
- 56.- Tu CL, Chang W, Bikle DD. (2011). The calcium-sensing receptordependent regulation of cell-cell adhesion and keratinocyte differentiation requires Rho and filamin A. J Invest Dermatol; 131: 1119-1128.

- 57.- Umeda J, Sano S, Kogawa K, Motoyama N, Yoshikawa K, Itami S, Kondoh G, Watanabe T and Takeda J. (2003). In vivo cooperation between Bcl-xL and phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway for the protection of epidermal keratinocytes from apoptosis. *FASEB J*; 17:610-620.
- 58.- Wada, K., Niida, M., Tanaka, M., & Kamitani, T. (2009). Ro52-mediated monoubiquitination of IKK β down-regulates NF- κ B signalling. *J of biochem*; 146(6), 821-832.
- 59.- Wilson Van G. (2007). In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology*; 54: 77-83.
- 60.- Wilson Van G. (2014). Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods in molecular Biology*; 1995: 33-41.
- 61.- Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. (2001). NF-Kappa-B-inducing kinase regulates the processing of NF-KappaB2 p100. *Mol Cell*; 7:401-409.
- 62.- Ziegler A-M, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Shapiro PE, Bale AE, Brash DE. (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of non melanoma skin cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:4216-4220.