



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE
CODIFICAN PARA EL FALL-39 Y VEGF EN LA LÍNEA
CELULAR RAJI ESTIMULADA CON LA PROTEÍNA
DE CHOQUE TÉRMICO RECOMBINANTE DE 60 kDa
DE *Streptococcus pyogenes* (rHSP60Sp).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

JOSÉ LUIS CAMACHO GARCÍA

MÉXICO, D.F.

2004.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidenta: **DRA. ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS**

Vocal: **Q.F.B. PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ**

Secretario: **DR. MARIO EUGENIO CANCINO DIAZ**

1er Suplente: **MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA**

2do. Suplente **SONIA MAYRA PEREZ TAPIA**

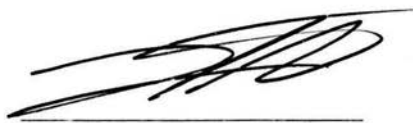
Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Inmunología Clínica I, Depto. De Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas – IPN.

Asesor del tema:

Sustentante:



Dr. Mario Eugenio Cancino Díaz



Camacho García José Luis

**GRACIAS A MIS PADRES,
POR TODO LO QUE HAN REALIZADO POR MI**

A MIS HERMANOS, POR SU EJEMPLO

**A ANGÉLICA, POR SU COMPAÑÍA Y AYUDA, SIN
LA CUAL ESTO NO SERÍA POSIBLE.**

**ASIMISMO, GRACIAS AL DR. MARIO E. CANCINO DÍAZ, POR EL
APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO**

**AL DR. LUIS JIMÉNEZ ZAMUDIO, POR PERMITIRME ESTAR EN SU
LABORATORIO**

**A LA M. EN C. ANGÉLICA MARÍA PABLO VELÁZQUEZ,
POR SU INVALUABLE ORIENTACIÓN Y ASESORÍA EN ESTE TRABAJO**

**A LA DRA. ANA ESTHER AGUILAR, POR LA AYUDA
QUE ME BRINDO.**

NUEVAMENTE, A TODOS, GRACIAS.

**GRACIAS AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA Y A LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS POR EL APOYO OTORGADO.**

**ESTA TESIS ES PARTE DE LOS PROYECTOS
FINANCIADOS POR CONACYT 38697-M Y CGPI-IPN
20030102.**

INDICE

	PÁGINAS
Lista de abreviaturas	i
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
Definición de la psoriasis	2
Datos epidemiológicos	2
Clasificación de la psoriasis	2
Cuadro Clínico	3
La piel en la psoriasis	4
Inmunología de la psoriasis	5
Antígenos asociados en la patogénesis de la psoriasis	6
Angiogénesis	10
Angiogénesis en la psoriasis	12
Péptidos antimicrobianos (AMPs)	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
Gen y plásmido utilizado	21
Inducción de la proteína recombinante	21
Purificación de la proteína recombinante	22
Línea celular Raji	23
Ensayo de estimulación	23
Obtención de RNA total	23
Transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	24

INDICE

	PÁGINAS
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Inducción y purificación de la proteína recombinante	27
Determinación del número óptimo de células para analizar la expresión de los angiogénicos	27
Ensayo de estimulación	31
V. CONCLUSIONES	38
VI. BIBLIOGRAFÍA	49

ABREVIATURAS

CD4+ Y CD8+	Marcador diferencial de células T de tipo 4 u 8
DTT	Ditiotritol
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FALL-39	Péptido antimicrobiano de origen humano
HIF-1α	Estructura alfa del factor 1 inducido por hipoxia
HLA	Antígeno leucocitario humano
HSP	Proteína de choque térmico
HSPs	Proteínas de choque térmico
HSP60Sp	Proteína de choque térmico de 60 kDa de <i>Streptococcus pyogenes</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LPS	Lipopolisacárido
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Psoriasis guttata
PP	Psoriasis en placa
pProEXHT	Plásmido de clonación y expresión. Contiene una secuencia que codifica para una cola de 6 residuos de histidinas que se fusiona con el gen de interés
PR39	Péptido antimicrobiano porcino.
rHSP60Sp	Proteína de choque térmico de 60 kDa de <i>Streptococcus</i>

ABREVIATURAS

	<i>pyogenes</i> recombinante
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la PCR
TGFα	Factor de crecimiento transformante
Th2	Células T cooperadoras de tipo 2
TNFα	Factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

I. INTRODUCCIÓN

En nuestro laboratorio se han realizado diversos trabajos encaminados a determinar la asociación entre la psoriasis y la proteína de choque térmico de 60 kDa de *Streptococcus pyogenes* (HSP60Sp). Inicialmente se determinó una posible reacción cruzada entre los antígenos de la piel psoriásica y la HSP60 del *S. pyogenes*. Al nivel de respuesta inmune humoral, hemos encontrado que los pacientes con psoriasis en placa presentan en sus sueros altos título de anticuerpos de la clase IgG que reconocen a esta proteína. Al estudiar la respuesta inmune celular, encontramos que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes psoriásicos y sujetos sanos se activaron en igual proporción cuando éstas células se estimularon con la HSP60Sp. Los linfocitos T CD4⁺ de los pacientes psoriásicos presentaron una tendencia de mayor activación hacia la HSP60Sp; los linfocitos T CD8⁺, de los pacientes se activaron igual que los sujetos sanos hacia la rHSP60Sp

Al trabajar con biopsias de piel lesionada y no lesionada de pacientes psoriásicos, Cancino-Gómez en su tesis de maestría encontró la expresión del mRNA de VEGF y FALL-39 solamente en la piel lesionada de los pacientes psoriásicos. En las biopsias de piel no lesionada y de sujetos sanos no se halló la expresión de éstos genes. La expresión del mRNA de HIF-1 α se observó en 9/10 muestras de piel lesionada y no se detectó la expresión de éste gen en las biopsias de piel no lesionada de los mismos pacientes. En las biopsias de piel de sujetos sanos se detectó la expresión del HIF-1 α en 2/10 de las muestras analizadas (12).

Ye *et al*, 2003 demostraron la expresión de VEGF y sus receptores en las líneas celulares HL-60 y Raji por RT-PCR, ELISA e inmunohistoquímica (102). La línea Raji de linfoblastos de células B, fue establecida por R. J. V. Pulvertaf en 1963 a partir de un linfoma de Burkitt en el maxilar izquierdo de un niño negro de 11 años.

El primer objetivo de este trabajo fue la expresión y purificación de la proteína recombinante (rHSP60Sp). Después se estudió el papel de la rHSP60Sp en la expresión de FALL39 y VEGF en la línea Raji. La hipótesis planteada fue que la rHSP60Sp induce la sobreexpresión de los genes FALL-39 y VEGF en la línea celular Raji.

II. ANTECEDENTES

Definición de la psoriasis

La psoriasis se define como una dermatosis inflamatoria crónica, asintomática, caracterizada por placas eritematoescamosas, bien definidas que se localizan principalmente en codos, rodillas, región sacra y piel cabelluda, pero puede afectar toda la superficie cutánea y las uñas. Hay hiperplasia epidérmica y queratopoyesis acelerada. Se desconoce la causa, pero parecen influir factores inmunitarios, genéticos, psicosomáticos, ambientales y bacteriológicos (4).

Datos epidemiológicos

La psoriasis afecta aproximadamente al 2-3% de la población mundial. Anualmente, 1.5 millones de pacientes psoriásicos en los Estados Unidos son vistos por los médicos. De acuerdo con la *National Psoriasis Foundation* (NPF), existen 150,000 – 260,000 casos nuevos reportados cada año con una edad promedio de 28 años. Además, aproximadamente el 5-10% de los pacientes podrían desarrollar psoriasis artrítica, con inflamación e hinchazón en la manos, pies y articulaciones (21). En México, se presenta en alrededor del 2% de la consulta dermatológica (4).

Clasificación de la psoriasis

Según la edad de presentación, la evolución clínica y los antecedentes genéticos, la psoriasis se clasifica en dos tipos (formas juvenil y del adulto). La psoriasis tipo I (juvenil) aparece en los pacientes aproximadamente a los 20 años. Presenta antecedentes familiares, y su asociación con el HLA Cw6 es del 85% y, en menor proporción con los antígenos B13 y B17. Este tipo de psoriasis es más generalizada, resistente al tratamiento, y más grave. La psoriasis tipo II (del adulto) es de aparición tardía, alrededor de los 60 años, rara vez hay antecedentes familiares, no hay relación con el HLA, la evolución clínica es benigna (4).

Cuadro clínico

La dermatosis es bilateral, con tendencia a la simetría; que predomina en piel cabelluda, salientes óseas como codos y rodillas, región sacra, caras de extensión de extremidades; en ocasiones afecta ombligo, palmas, plantas, genitales y pliegues de flexión (psoriasis invertida). Las lesiones a veces son únicas, pero también pueden ser generalizadas (4).

La dermatosis está constituida por eritema y escamas que se agrupan en placas de bordes netos, de forma y tamaño muy variables; la descamación es blanca, nacarada, de aspecto micáceo; puede cubrir toda la placa o parte de la misma. Las lesiones pequeñas predominan durante la niñez. En un alto porcentaje de los enfermos puede afectar las uñas; se observan erosiones puntiformes (signo del dedal), hiperqueratosis subungueal, onicólisis y leuconiquia (4).

Existen cinco formas reconocidas de psoriasis: placa (también llamada psoriasis vulgaris), guttata, inversa, eritrodérmica y pustular. Un paciente puede exhibir una o más formas al mismo tiempo y la enfermedad puede cambiar de una a otra forma (4, 21). Mientras que la apariencia puede variar, cada forma está caracterizada por hiperproliferación epidermal de queratinocitos, diferenciación anormal de queratinocitos e infiltración de células inmunes. La forma más común y más estudiada de psoriasis es la psoriasis en placa (PP), alrededor del 80% de las personas con psoriasis presentan este tipo. La PP aparece en cualquier parte de la piel, principalmente en rodillas, codos, cuero cabelludo, tronco y uñas. Este tipo de psoriasis tiende a ser crónica, aunque la remisión espontánea puede ocurrir. En la psoriasis guttata (PG), las lesiones psoriásicas están presentes en forma de gotas individuales, rojas y pequeñas en la piel. La PG comienza como una pequeña lesión (1 mm) en el tronco, frecuentemente asociada con una historia precedente de una infección del tracto superior por estreptococo. En la PG las lesiones se limpian aproximadamente en 12 semanas, aunque el 70% de los pacientes en un año desarrollan la forma en placa (PP) que es la forma crónica de la enfermedad, lo cual sugiere que los dos tipos clínicos están ligados por factores comunes. La erupción de la psoriasis guttata es algunas veces observada en pacientes que ya habían presentado placas crónicas. Los otros tipos de psoriasis se presentan en menor frecuencia que la PP y la PG (7, 21, 94).

La piel en la psoriasis

A escala molecular e histológica, la PP está caracterizada por una marcada hiperproliferación de queratinocitos. Existe una pérdida de la capa granular con el acompañamiento de pérdida de expresión de loricrina y filagrina. Existe una sobreexpresión de otros marcadores de diferenciación tales como involucrina, y TGasa I, así como la expresión de genes tales como el factor inhibitorio de migración relacionado a la proteína 8 (MRP-8) y antileucoproteína derivada de la piel (SKALP) que no se encuentra en la epidermis normal. La expresión de queratinas suprabasales normales K1 y K10 está inhibida y reemplazadas por la expresión de queratinas hiperproliferativas K6 y K16 (40). Relacionada a esta hiperproliferación, se presenta un incremento en la expresión del receptor de IL-8 (83), citocinas IL-1, IL-6 e IL-8 (7, 18, 41), el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF-R) y sus ligandos (23), factor de crecimiento transformante α (TGF- α), anfiregulina (40) y la sobreexpresión de IL-13R α 1 en la piel lesionada de biopsias de pacientes psoriásicos cuando se compara con biopsias de sujetos sanos (11). Se presenta una amplia infiltración de linfocitos T en las regiones afectadas de la piel con linfocitos T CD4⁺ en la dermis y linfocitos T CD8⁺ en la epidermis. Estos linfocitos secretan citocinas como IL-2, interferon- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), con alteración en la proliferación y diferenciación de queratinocitos (21).

Se estima que en la epidermis de un paciente psoriásico el ciclo celular se efectúa en un tiempo de 37.5 hrs. comparado con 152 hrs. en la epidermis normal. La apoptosis es uno de los mecanismos que regula y mantiene la homeostasis de los queratinocitos en la piel. En un estudio se analizó la expresión de las proteínas asociadas a promover (Fas) o reprimir (Bcl-2, bcl-x, CD40) la apoptosis, se encontró que la proteína Bcl-x está sobreexpresada en las lesiones psoriásicas. La sobreexpresión de ésta molécula en las lesiones psoriásicas probablemente inhibe la apoptosis y esto altera la homeostasis epidérmica (98).

En otros estudios se reporta que la prolactina se encuentra aumentada en los sueros de los pacientes psoriásicos. Esta proteína tiene un efecto proliferativo *in vitro* sobre los queratinocitos humanos (38). El factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF), el cual

es expresado por las células estromales, es otro de los potentes mitógenos de queratinocitos humanos. En los tejidos psoriásicos, se ha encontrado incrementada la expresión de los transcritos del KGF y para el receptor de KGF (KGFR) (28).

Inmunología de la psoriasis

Existe una amplia evidencia de que la psoriasis es causada por un defecto en el sistema inmune y se ha demostrado que la activación de los linfocitos es un paso importante en el proceso de la enfermedad (5). En las lesiones psoriásicas se presentan linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺. Los linfocitos T CD4⁺ aislados de lesiones son preferencialmente linfocitos T_H1 los cuales al liberar sus citocinas y factores de crecimiento causan la hiperproliferación de los queratinocitos (10, 75). Además, se sugiere la participación de los superantígenos bacterianos en la patogénesis de la enfermedad. De suma importancia es el hecho de que la intención de las terapias es suprimir el sistema inmune o agentes anti-inflamatorios cuyos blancos son los linfocitos T o sus derivados los cuales han sido efectivos en el tratamiento temporal de la enfermedad (21, 69). La ciclosporina A es un medicamento que se ha utilizado en tratamiento de la psoriasis. La ciclosporina A actúa inhibiendo la acción de los factores de transcripción NF-AT (factor nuclear de linfocitos T activados), AP-3 y NF-κB para la expresión del gen que codifica la IL-2. Estos factores de transcripción son necesarios para los eventos tempranos en la activación de linfocitos T mediados por antígenos y la producción de IL-2 (5, 21). El FK506 (Tacrolimus, Prograf), es otro inmunosupresivo con un mecanismo de acción similar a la ciclosporina. Este bloquea la producción de IL-2 y la activación de linfocitos T inhibiendo la acción del factor de transcripción NF-AT (5, 21).

En un estudio se evaluó la capacidad de linfocitos T, provenientes de una lesión y de sangre periférica, para producir IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-10 intracelularmente. La síntesis de citocinas fue inducida por activación con PMA/ionomicina (en presencia de Brefeldina A, la cual inhibe la exocitosis de éstas citocinas). Después de la estimulación, se encontraron altos porcentajes de linfocitos T CD8 y CD4 epidérmicos capaces de producir IFN-γ, TNF-α e IL-2; mientras que pocos linfocitos T < 11% expresaron IL-4 e IL-10. Tanto linfocitos T CD8⁺ como T CD4⁺ fueron capaces de desempeñar funciones efectoras

tipo 1 (T_{c1} y T_{H1} , respectivamente). Este estudio reveló una diferenciación tipo 1 tanto en áreas lesionadas como en sangre periférica, lo cual podría indicar un desequilibrio dentro de la población de linfocitos T, que contribuye a mantener la activación inmunológica de linfocitos T encontrada en esta enfermedad (6).

En las lesiones de los pacientes psoriásicos también se encuentran infiltrados de neutrófilos que migran del compartimiento vascular dérmico a través de las capas de la epidermis al estrato córneo que forman los microabscesos de *Munro*. El movimiento de neutrófilos en el tejido requiere su unión primeramente a las paredes celulares del endotelio. En un ensayo de adhesión *in vitro* demostró que los neutrófilos aislados de los pacientes psoriásicos aumentaban la adhesión y éste aumentó se correlacionó con la severidad de la enfermedad. Se han identificado varios factores quimiotácticos en las lesiones psoriásicas que podrían ser los responsables de la entrada de neutrófilos a la epidermis como la IL-8 (54).

Antígenos asociados en la patogénesis de la psoriasis

La naturaleza del antígeno responsable de la producción de los eventos inmunológicos en la psoriasis ha dado pie a diversas líneas de investigación. Una de ellas involucra examinar la distribución de varios receptores de linfocitos T en la sangre y piel de pacientes psoriásicos. Otras líneas han tratado de identificar el antígeno específico (tanto exógeno como endógeno) en pacientes con psoriasis que podrían activar el sistema inmune. Se ha sugerido como candidatos a: retrovirus (virus de inmunodeficiencia adquirida 1), superantígenos derivados de bacterias, proteína M estreptocócica y homólogos de queratinas derivados de péptidos, neuropéptidos tales como la sustancia P y papiloma virus humano (64).

Se ha propuesto que cierta secuencia de aminoácidos de la queratina es común con la proteína M, el blanco principal de linfocitos T autoreactivos en la psoriasis. Un ejemplo de esto, es la K17 que comparte la secuencia ALEEAN con la proteína M (42).

Tres líneas principales de investigación indican que la activación de linfocitos tanto policlonal como oligoclonal contribuyen en el inicio y persistencia de la psoriasis. Estudios en pacientes con psoriasis guttata han implicado al superantígeno exotoxina estreptocócica pirogénica tipo C (SPEC) en el inicio de las lesiones de PG por un superantígeno polidonal que dirige la expansión de linfocitos VB2. En contraste, los linfocitos T CD8⁺ intraepidérmicos encontrados en placas psoriásicas crónicas muestran una expansión oligoclonal VB consistente con la estimulación de antígeno clásica. Se ha visto que la activación de leucocitos de sangre periférica de pacientes psoriásicos por el superantígeno enterotoxina B estafilocócica (SEB) e IL-2 es suficiente para iniciar las lesiones psoriásicas en ratones SCID (67).

Sin embargo, dos líneas de investigación demostraron que linfocitos de sangre periférica de pacientes psoriásicos respondieron de manera baja a SAGs estreptocócicos. En el primer caso, sugieren la presencia de inhibidores séricos que cohiben específicamente la respuesta celular de T a los SAGs en los pacientes psoriásicos. En el segundo caso, que los SAGs liberados de una infección de *S. pyogenes* focal inducen una activación transitoria de linfocitos T, que lleva al desarrollo de una erupción de la piel y subsecuentemente, a una anergia temporal de linfocitos T hacia estas toxinas (48, 93).

Las proteínas de choque térmico (HSPs), las cuales están expresadas constitutivamente en todas las células, son esenciales para diversos procesos celulares, tales como plegamiento de proteínas, protección de proteínas de la desnaturalización o agregación, y facilitación del transporte de a través de los canales de la membrana. Una amplia variedad de estímulos estresantes tales como el choque térmico, radiación ultravioleta e infecciones bacterianas o virales, inducen un incremento en la síntesis intracelular de las HSPs (96). En nuestro equipo de investigación se han llevado a cabo diversos estudios que indican que las proteínas de choque térmico del *Streptococcus pyogenes* pueden ser antígenos inmunodominantes de la bacteria para las células inmunológicas de los pacientes psoriásicos.

Villeda-Gabriel *et al* en 1998 empleando inmunofluorescencia indirecta, reportaron que la piel de los enfermos con psoriasis es reconocida por un suero de conejo anti- *S. pyogenes*, mientras que esta reacción es negativa en el caso de la piel de los sujetos

sanos (95). Por otro lado, Pérez-Lorenzo *et al* en 1998 reportaron que en el suero de los pacientes con psoriasis existen autoanticuerpos que reconocen la piel lesionada de los pacientes psoriásicos y no la piel sana de los mismos. Además, estos autoanticuerpos presentes en los sueros de estos pacientes perdieron la reactividad hacia los antígenos de la piel cuando estos fueron inmunoabsorbidos con un extracto proteico total de *S. pyogenes* (74). Recientemente en el 2002, Sánchez-Huerta encontró que estos autoanticuerpos también pueden ser inmunoabsorbidos con la HSP60 del *S. pyogenes*. Estos resultados indican una posible reacción cruzada entre los antígenos de la piel psoriásica y la HSP60 del *S. pyogenes* (80).

Por otro lado, mediante inmunoelectrotransferencia (IET) y ELISA se encontró que en los sueros de los pacientes con psoriasis están presentes altos títulos de anticuerpos que reconocen las fracciones proteicas de 14, 60 y 70 kDa de *S. pyogenes* (68, 95). Estas fracciones coincidían en peso molecular con las proteínas de choque térmico del *Streptococcus pyogenes* las cuales se indujeron con choque térmico a 45°C (68).

Ruiz-González en el 2000 trabajó con la HSP60 del *S. pyogenes* recombinante (rHSP60Sp) y encontró que los pacientes con psoriasis en placa presentan en sus sueros altos título de anticuerpos de la clase IgG que reconocen a esta proteína (78). Ramírez-Reséndiz en el 2001, trabajó con la HSP70 del *S. pyogenes* recombinante, pero no encontró ninguna relación (77).

Basándose en los resultados obtenidos por Ruiz-González, Sánchez-Becerra en el 2002 truncó por PCR el gen que codifica a la HSP60 de *S. pyogenes* y obtiene cuatro polipéptidos recombinantes de esta proteína con peso molecular de 25, 29, 38 y 46 kDa respectivamente. En estos polipéptidos se eliminaron sitios antigénicos para células B y células T los cuales fueron detectados teóricamente por dos diferentes programas de computación. El programa para epítomos de B se basa en los sitios más hidrofílicos de la proteína y el programa para epítomos de T se basa en la afinidad que tienen los péptidos de la proteína para unirse con la molécula HLA-Cw6 el cual esta más asociado con la psoriasis. Cuando se trabajó con los polipéptidos antes mencionados y los sueros de pacientes psoriásicos con alta respuesta hacia la rHSP60Sp, se encontró que la región

carboxilo-terminal 415-543 y la región amino-terminal 1-224 de la HSP60Sp son las regiones más reconocidas por los anticuerpos de los pacientes psoriásicos (79).

Pablo Velázquez en el 2003 estudió la activación de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y linfocitos NKT (CD94⁺ y CD161⁺) hacia las proteínas de choque térmico de 60 y 70 kDa recombinantes de *Streptococcus pyogenes* (rHSP60Sp y rHSP70Sp) en un grupo de 12 pacientes con psoriasis y un grupo de 13 sujetos sanos. La activación celular se determinó por citometría de flujo mediante la detección de la molécula CD69. Como proteína testigo, se utilizó la rHSP60 de *E. coli* (rHSP60Ec). Además, se buscó con polipéptidos recombinantes de la HSP60Sp, el epítipo antigénico de esta proteína. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y linfocitos NKT de los pacientes con psoriasis y de los sujetos sanos frente a la rHSP60Sp ($p > 0.05$). Con la rHSP70Sp y la rHSP60Ec tampoco se encontró diferencia entre la activación de linfocitos T CD4⁺ y TCD8⁺ de los pacientes y de los sujetos sanos ($p > 0.05$). Éstos resultados sugieren que, aparentemente, la rHSP60Sp y la rHSP70Sp no están involucradas en la patogénesis de la psoriasis (70).

Al buscar el epítipo de la HSP60Sp encargado de la activación de los linfocitos T se encontró lo siguiente. Al eliminarse la región carboxilo terminal 415-543 (polipéptido de 46 kDa) de la proteína, la activación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ disminuyó alrededor de un 50% en los pacientes y sujetos sanos con respecto a la activación observada con la proteína completa. En el caso de los linfocitos NKT de pacientes psoriásicos, la respuesta celular disminuyó cerca del 20%. Cuando se activaron los linfocitos T CD8⁺ y TCD4⁺ con el polipéptido de 38 kDa (del cual se eliminó la región de aminoácidos 350-543) no se alteró la activación con respecto al polipéptido de 46 kDa. En el caso de los linfocitos NKT, la activación celular fue similar a la observada con la proteína completa. Con el polipéptido de 29 kDa (del cual se eliminó la región 263-543), los linfocitos TCD4⁺ de los sujetos sanos no se activaron y en las otras subpoblaciones la activación celular disminuyó hasta un 90%. Sin embargo, con el polipéptido de 25 kDa la activación de todas las células en ambos grupos de sujetos estudiados se recuperó. Estos resultados sugieren que en las regiones de aminoácidos 415-543, 263-543 y 1-224 de la HSP60Sp, posiblemente, se localizan los epítipos para los linfocitos T.

Por último Pérez-Lorenzo *et al*, 2000 estudió la respuesta celular (mediante el método de incorporación de timidina tritiada) hacia las proteínas de choque térmico de 60 y 70 kDa de *Streptococcus pyogenes* recombinante en pacientes psoriásicos y en sujetos sanos. En este trabajo también se emplearon extractos solubles totales de *Streptococcus pyogenes* antes y después de la inducción de choque térmico (EST37Sp y EST42Sp, respectivamente). Cuando midió la respuesta linfoproliferativa con ambos extractos obtuvo respuestas mayores que a la respuesta obtenida con la PHA tanto en el grupo de pacientes como en el grupo de sujetos sanos. Al emplear ambas proteínas de choque térmico recombinantes observó que la respuesta linfoproliferativa de los pacientes con psoriasis hacia la rHSP70Sp tiene una tendencia a ser mayor que la respuesta de los sujetos sanos. No se encontró una diferencia en la respuesta hacia la rHSP60Sp entre los pacientes y los sujetos sanos (73, 74).

Angiogenésis

El desarrollo de un suministro vascular es un requerimiento fundamental para el desarrollo y diferenciación de órganos durante la embriogenésis, así como en la reparación de tejidos y las funciones reproductivas en los adultos durante el ciclo reproductivo de la mujer fértil, en el ovario, durante el crecimiento de la red capilar folicular y en la formación de la placenta (29, 30).

La formación y el crecimiento de los vasos es un fenómeno estrictamente regulado. Cuando se ha complementado el crecimiento vascular, la angiogenésis se convierte en un proceso patológico que acompaña a la aparición de enfermedades neoplásicas y no neoplásicas (81).

El proceso de angiogenésis ocurre de una manera general como una serie ordenada de eventos: los tejidos lesionados o enfermos producen y liberan factores de crecimiento angiogénicos que se difunden a los tejidos cercanos. Los factores de crecimiento angiogénicos se unen a sus receptores específicos localizados en las células del endotelio de los vasos sanguíneos cercanos preexistentes. Una vez que se da la unión del factor de

crecimiento con su receptor, las células del endotelio se activan y envían señales desde la membrana celular al núcleo. La maquinaria de las células del endotelio empieza a producir nuevas moléculas (otros factores angiogénicos) y enzimas. Las enzimas disuelven los agujeros diminutos en la membrana del estrato basal alrededor de los vasos sanguíneos preexistentes. Las células del endotelio empiezan a proliferarse y migran hacia fuera a través de los agujeros disueltos hacia el tejido enfermo (tumor). En este tejido se expresan las integrinas (avb3 y avb5) las cuales sirven como anclaje y sostén para ayudar el brote del nuevo vaso sanguíneo el cual crece hacia delante. También se producen las enzimas metaloproteinasas de la matriz (MMPs) para disolver el tejido delante de la punta del vaso que esta creciendo para acomodarlo. Como los vasos se extienden, el tejido es reacomodado alrededor del vaso. Las células del endotelio van creciendo hasta enrollarse para formar el tubo del vaso sanguíneo. Los tubos de los vasos sanguíneos individuales se conectan para formar la red de vasos sanguíneos donde puede circular sangre. Finalmente, por los tubos de los vasos sanguíneos recién formados se estabilizan las células del músculo liso para darles un apoyo estructural y el flujo de sangre empieza (81).

La remodelación de la matriz extracelular es un regulador importante de la neovascularización, morfogénesis e invasión vascular. El estado de inicio en la angiogénesis se propone que es una degradación proteolítica de la membrana basal capilar por MMPs y serinproteasas (71, 72). Los miembros de la familia de las MMPs tienen un papel importante en la angiogénesis (47). El TIMP3 (inhibidor tisular de metaloproteinasas-3) es una proteína que se une a la matriz extracelular y es un potente inhibidor de la angiogénesis y el crecimiento tumoral (3). TIMP3 es un miembro de la familia de inhibidores endógenos de MMP, de la cual existente cuatro miembros actualmente (TIMP1 hasta TIMP4). En virtud de su actividad inhibitoria de MMP, los miembros de la familia de TIMP tienen una función potencialmente importante en la regulación de la composición de la matriz y, por ende, en un amplio rango de procesos fisiológicos que incluyen el crecimiento celular, invasión, migración, angiogénesis, transformación y apoptosis. Se ha demostrado que TIMP3 inhibe la angiogénesis mediada por VEGF y han identificado el mecanismo por el cual ocurre lo anterior: TIMP3 bloquea la unión de VEGF con su receptor VEGFR-2 e inhibe la cascada de señalización y la

angiogénesis. Esta propiedad al parecer es independiente de su actividad inhibitoria de MMP, indicando así una nueva función para esta célula (76).

Angiogenénesis en la psoriasis

La angiogénesis esta implicada en la patogénesis de una variedad de enfermedades: retinopatías proliferativas, tumores, artritis reumatoide y psoriasis (32).

La búsqueda de reguladores potenciales de la angiogénesis ha propuesto los siguientes candidatos: factor de crecimiento de los fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento de los fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), TGF- β , factor de crecimiento de hepatocitos, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), angiogenina e IL-8 (31, 32, 52).

El trabajo realizado por diversos laboratorios durante las pasadas décadas ha elucidado el papel fundamental del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en la regulación de la angiogénesis (24, 25, 26, 27). Evidencia reciente indica que el crecimiento de nuevos vasos y su maduración implica una serie de procesos complejos y coordinados que requieren una activación secuencial de una serie de receptores por sus ligandos (13, 85, 86); pero, la señalización de VEGF representa un paso limitante en la angiogénesis fisiológica. VEGF también es importante en la angiogénesis patológica, tal como la asociada con el crecimiento tumoral (25).

En los 80s VEGF fue identificada independientemente como factor de permeabilidad vascular (VPF) y como factor de crecimiento específico del endotelio vascular (56, 84). La clonación molecular de estos genes codificantes para éstas "dos" proteínas revelaron que las proteínas eran esencialmente la misma proteína codificada por un solo gen (gen VEGF). Así, esta proteína se refiere como VEGF, VEGF/VPF o, a veces, VPF.

El gen VEGF pertenece a una familia que incluyen: factor de crecimiento placentar (PLGF), VEGFB, VEGFC y VEGFD. En particular, a VEGF también se le denomina como

VEGFA el cual es el principal regulador de la angiogénesis normal y anormal, incluyendo la asociada con tumores y síndromes intraoculares (87). VEGF se distingue de otros factores angiogénicos por las siguientes características: Primero, su lado NH₂ terminal es precedido por una típica secuencia señal, por lo que VEGF puede ser secretado por células intactas. Segundo, sus sitios de unión, que incluyen receptores tirosinquinasa flt y flk, los cuales están presentes en células del endotelio pero no en otro tipo celular. Por lo tanto, VEGF se considera un mitógeno específico para las células del endotelio (92).

VEGF promueve la angiogénesis en modelos tridimensionales *in vitro*, por lo que se demuestra que existe un potente sinergismo entre VEGF y bFGF en la inducción de éste efecto (71). Se ha demostrado también que VEGF promueve la expresión de VCAM-1 y de ICAM-1 en células endoteliales. Esta inducción resulta en la adhesión de células NK activadas a las células endoteliales, mediadas por interacciones específicas de VCAM-1 e ICAM-1 endoteliales con CD18 y VLA-4 en la superficie de células NK (60).

El gen humano VEGFA está organizado en ocho exones separados por siete intrones (49). El splicing alternativo de exones da como resultado la generación de cuatro diferentes isoformas (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆) teniendo respectivamente 121, 165, 189 y 206 aminoácidos después de la escisión de la secuencia señal (49). VEGF₁₆₅, la isoforma predominante, carece de los residuos codificados por el exón 6, mientras VEGF₁₂₁, carece de los residuos codificados por los exones 6 y 7. VEGF nativa es una glicoproteína dimérica de unión a heparina de 45 kDa y es mitogénica para células endoteliales (92).

Existen diversos mecanismos que han demostrado su participación en la regulación de la expresión del gen VEGF; entre los que se encuentran la hipoxia, factores de crecimiento, diferenciación, transformación y estrógenos (87). La tensión de oxígeno representa un papel principal, tanto *in vitro* como *in vivo*. La expresión de mRNA de VEGF es inducida rápida y reversiblemente por la exposición a una baja pO₂ en una variedad de tipos celulares normales y transformados (61, 89). Bajo condiciones hipóxicas, el factor transcripcional HIF1 α (factor inducido por hipoxia-1) se encuentra estabilizado y translocado en el núcleo. En el núcleo, este factor coopera con otro factor relacionado,

HIF1 β para activar el gen VEGF via un motif específico HRE (elemento de respuesta a hipoxia) (87). La proteína VHL, el producto del gen responsable de la enfermedad von Hippel Lindau, se ha demostrado que esta involucrada directamente en la degradación de la proteína HIF-1 α bajo condiciones normóxicas. Así, la pérdida de funciones de VHL resulta en la sobrerregulación constitutiva del gen VEGF, lo cual sugiere que la alta susceptibilidad del cáncer de cerebro y renal en pacientes con VHL, es debida, al menos en parte, a la sobrerregulación anormal de un factor angiogénico, VEGF (87).

Los factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidérmico, TGF- α , TGF- β , el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y el FGF sobrerregulan la expresión del mRNA VEGF, sugiriendo que la liberación autocrina o paracrina de tales factores coopera con la hipoxia local en la regulación de la liberación de VEGF en el microambiente (27). La exposición de queratinocitos humanos a suero, factor de crecimiento epidérmico, TGF- β , o KGF deriva en una inducción marcada de la expresión del mRNA de VEGF (33). IL-6 ha demostrado inducir significativamente la expresión de VEGF en diversas líneas celulares (15). La diferenciación celular ha mostrado un papel importante en la regulación de la expresión del gen VEGF (14).

VEGF se une a dos receptores relacionados a las tirosinquinazas (RTKs), VEGFR-1 y VEGFR-2. Ambos VEGFR-1 y VEGFR-2 tienen siete dominios tipo inmunoglobulina en su dominio extracelular, una sola región transmembranal y una secuencia consenso tirosinquinasa que es interrumpida por un dominio insertado de quinasa (27). VEGFR-1 (Flt-1) tiene la más alta afinidad a VEGF entre los receptores de VEGF, pero su actividad tirosinquinasa es muy débil. Por otro lado, VEGFR-2 (KDR o Flk-1) tiene una débil afinidad por VEGF, sin embargo, su actividad tirosinquinasa es tan fuerte como otros receptores tirosinquinasa representativos tales como el receptor de EGF (87). De ese modo, VEGFR-2 es el principal mediador de los efectos mitogénicos y angiogénicos de VEGF (27).

VEGF se expresa en una variedad de líneas celulares derivadas de varias malignidades hematológicas que incluyen el linfoma de Burkitt y el mieloma múltiple (37). La expresión de VEGF y sus receptores fue detectada en las líneas celulares HL-60 y Raji por RT-PCR,

ELISA e inmunohistoquímica. En este trabajo también se reportó que la proteína VEGF es secretada al microambiente extracelular (102).

Se ha demostrado que la expresión de VEGF se encuentra incrementada en la piel psoriásica. Además, los dos receptores de VEGF (KDR y Flt-1), están también sobreexpresados. TGF- α , una citosina que también se encuentra sobreexpresada en la epidermis psoriásica, induce la expresión del gen de VEGF en el cultivo de queratinocitos. Por lo que, Detmar y sus colaboradores sugirieron que TGF- α regula la expresión de VEGF en la psoriasis mediante un mecanismo autocrino, dirigiendo a una hiperpermeabilidad vascular y hacia la angiogénesis (19).

Péptidos antimicrobianos (AMPs)

La existencia de AMPs se conoce durante muchas décadas, pero hasta ahora se ha reconocido que su función es esencial en la respuesta inmune. Participan primeramente en el sistema inmune innato y se usan como primera línea de la defensa inmune por varios organismos incluyendo plantas, insectos, bacterias y vertebrados. Como efectores de la inmunidad innata, los AMPs matan directamente un amplio espectro de microorganismos, incluyendo bacterias G(+) y G(-), hongos y ciertos virus. Además, estos péptidos interactúan con el propio hospedero, desencadenando eventos que complementan su papel como antibióticos (35).

La mayoría de los AMPs son moléculas catiónicas (polares) con regiones de separación hidrofóbicas y cargadas espaciadas. Estas características estructurales son importantes para el mecanismo de acción propuesto de los AMPs. Independientemente de sus características los AMPs de varias familias difieren en tamaño, secuencia de aminoácidos y ciertos motifs estructurales (9). Basándonos en sus propiedades químicas, los AMPs pueden dividirse en cinco grupos: *i)* péptidos lineales carentes de cisteína, a menudo formando hélices anfipáticas; *ii)* péptidos lineales con una alta proporción de ciertos residuos como prolina y arginina; *iii)* péptidos formando espirales con un puente disulfuro; *iv)* péptidos con dos o más puentes disulfuro, normalmente formando estructuras de hoja-

β ; γ , ν) péptidos derivados de moléculas amplias con otras funciones conocidas. Basándonos en sus características funcionales, los AMPs pueden dividirse en dos grupos: *i*) aquellos, como las defensinas, que se acumulan en los gránulos de los fagocitos y *ii*) aquellos que son liberados hacia los fluidos del cuerpo o capas epiteliales (1).

Los AMPs son genes-codificados, lo que significa que un gen codifica para un péptido. El producto primario traducido es un prepropéptido consistente en una secuencia señal N-terminal que es el blanco del retículo endoplásmico, un pro segmento, y un péptido catiónico C-terminal que tiene actividades antimicrobianas después de la escisión. El pro segmento a menudo es aniónico en carga y tiene diversas funciones biológicas que incluyen el correcto desdoblamiento de la parte C-terminal, tráfico intracelular o la inhibición de la actividad del péptido maduro. El propéptido sufre la escisión durante los últimos estados del proceso intracelular o después de la secreción hacia el espacio extracelular (9, 88).

Se ha demostrado que los pacientes con psoriasis tienen una baja incidencia de infecciones. Esta resistencia a infecciones se ha propuesto que es debido a un incremento en los AMPs observada en la piel de estos pacientes (17, 22, 34, 46, 82).

Se han caracterizado dos familias de AMPs en mamíferos principalmente: las defensinas y las catelicidinas (82). El nombre de la familia de las catelicidinas se basa en su limitada homología a la catelina, una proteína acrónima del inhibidor de la catepsina-L y un miembro de la familia de la cistatina de los inhibidores de cistein-proteasa (88). Las catelicidinas consisten en un péptido señal N-terminal, un dominio tipo catelina (inhibidor catepsina L) altamente conservado en la mitad de la molécula y un dominio antimicrobiano menos conservado C-terminal (Figura 1). Cerca de 30 miembros de la familia de las catelicidinas han sido identificados en varios mamíferos; sin embargo, los humanos producen solamente una catelicidina llamada hCAP18 (36).

La familia de las catelicidinas debe ser liberada de su precursor inactivo a través de varios pasos protelíticos. Una vez liberados, éstos péptidos pueden realizar sus funciones antimicrobianas tanto como no sean degradados por proteasas. Entre las catelicidinas de

mamíferos, la resistencia natural a la degradación proteolítica la brinda la secuencia rica en prolina, un residuo cíclico que se sabe que bloquea el mecanismo de las serinproteasas (88). La parte C-terminal, es decir, el dominio antimicrobiano, debe ser escindido por una proteasa apropiada. Por ejemplo, en el caso de la catelicidina humana hCAP18 es escindida por la proteinasa 3 que libera el LL-37 como un péptido activo después de la exocitosis (91). Se llama LL-37 porque comienza con dos residuos de leucina y su tamaño es de 37 residuos de aa (43). Los péptidos antimicrobianos C-terminales de las catelicidinas tienen estructuras variables. Algunas son hélice- α , (como hCAP28/LL-37 y CAP18 de conejo). Otros (como PR39 y bactenecinas) son ricos en prolina/arginina, mostrando una estructura tipo poliprolina. Las catelicidinas están guardadas primeramente en los gránulos de los neutrófilos de varias especies y pueden ser liberados extracelularmente después de la activación de neutrófilos (1, 16, 103). Sin embargo, hCAP18/LL-37 también se expresa en células epiteliales (1, 66), monocitos, célula NK, células B, células T $\gamma\delta$ (2) y es inducida en queratinocitos en respuesta a inflamación (8, 34).

PR-39, un miembro de las catelicidinas porcinas, induce quimiotaxis y movilización de Ca^{2+} en los neutrófilos porcinos (50). hCAP-18/LL-37 es quimiotáctico para los neutrófilos, monocitos y linfocitos T humanos (2). La actividad quimiotáctica del LL-37 hacia los linfocitos T muestra selectividad, debido a que induce la migración de linfocitos TCD4 pero no CD8 (2). LL-37 induce la movilización de Ca^{2+} en leucocitos (99). La característica del LL-37 de inducir la movilización de Ca^{2+} en monocitos se debe al receptor del LL-37, el FPRL1 (formyl peptide receptor-like-1) (99, 100). La interacción de un ligando quimiotáctico con su correspondiente ligando resulta en la activación de células blanco, implica que LL-37 es un activador endógeno de las células que expresan FPRL1 (101).

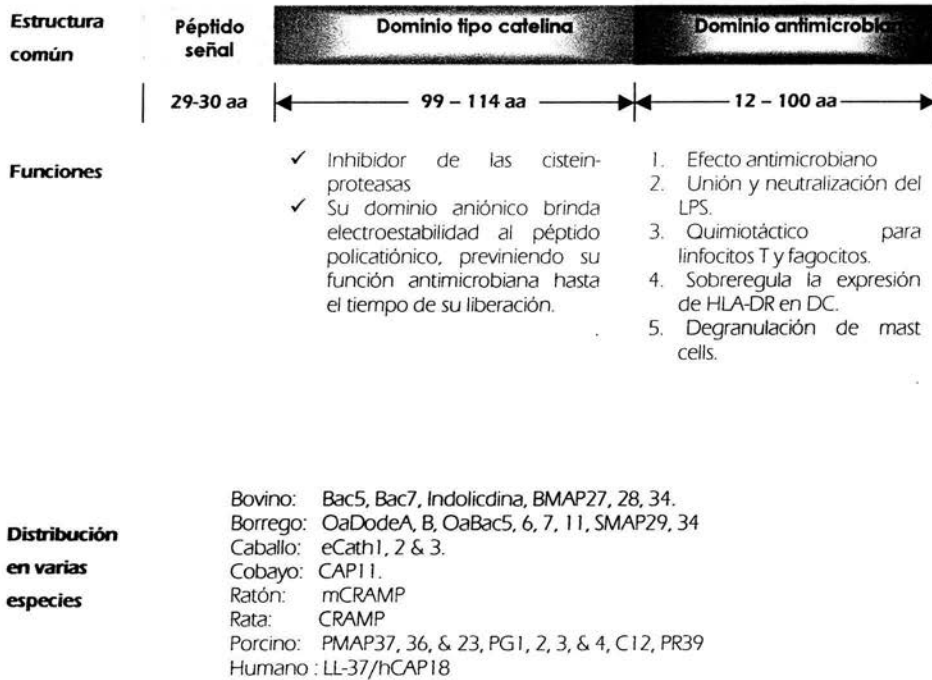


Figura 1. Estructura función y distribución de especies de las catelicidinas. Varias catelicidinas has sido identificadas en diversos mamíferos. Todas las catelicidinas tienen una estructura primaria que contiene: un péptido señal N-terminal, un dominio tipo catelina altamente conservado en la mitad y un dominio antimicrobiano C-terminal altamente variable. Se describen las funciones de los dos últimos dominios (Tomado de Shinnar *et al*, 2003 y de Yang *et al*, 2001).

El PR-39 es un péptido de 39 aa compuesto por 49% de prolina y 24% de arginina con actividad contra bacterias Gram-negativas (43, 44). El PR-39 se purificó inicialmente del intestino del cerdo, pero ahora se ha encontrado en los macrófagos y en otros tipos celulares. El PR-39 es secretado como un pre-péptido que rápidamente se corta por el extremo N-terminal, dando origen al péptido maduro de 39 aa. El péptido maduro presenta una secuencia líder hidrofílica, lo que permite atravesar las membranas de las células. Al estudiar la actividad biológica del PR-39, se encontró que induce la angiogénesis *in vivo* e incrementa los niveles celulares de HIF-1 α ; el efecto que se le atribuye al PR-39 es el de inhibir el sistema ubiquitin-proteosoma, el cual degrada a HIF-1 α (57).

En una librería genómica humana, se buscó el gen homólogo con una sonda del PR-39 del cerdo. Se encontró un péptido antimicrobiano con características parecidas al precursor del PR-39. Este gen se encontró expresado en la médula ósea y en testículo. Este péptido de 39 aa se le nombró FALL-39, ya que las primeras letras indican sus cuatro primeros residuos y el número correspondiente a los subsecuentes 39 aa. Cuando se clonó el gen del pre-FALL-39 se encontró que codifica para una proteína parecida a la catelina con 170 residuos de aa (1). Ambos péptidos, tanto PR-39 del cerdo como el FALL-39 del humano, pertenecen a la familia de los péptidos antimicrobianos (43).

Todos los genes de las catelicidinas hasta ahora caracterizados son compactos y están organizados de la misma manera. Contienen cuatro exones, donde los primeros tres exones codifican el péptido señal y la proregion catelina. En todos éstos genes, el cuarto exon codifica para el péptido antimicrobiano maduro y para los sitios de procesamiento (43).

La comparación entre PR-39 y FALL-39 revela que el alto grado de conservación no es sólo en la región precatelina (exones 1-3), sino también en los intrones 2 y 3 y las primeras 183 pb del promotor (Figura 2).

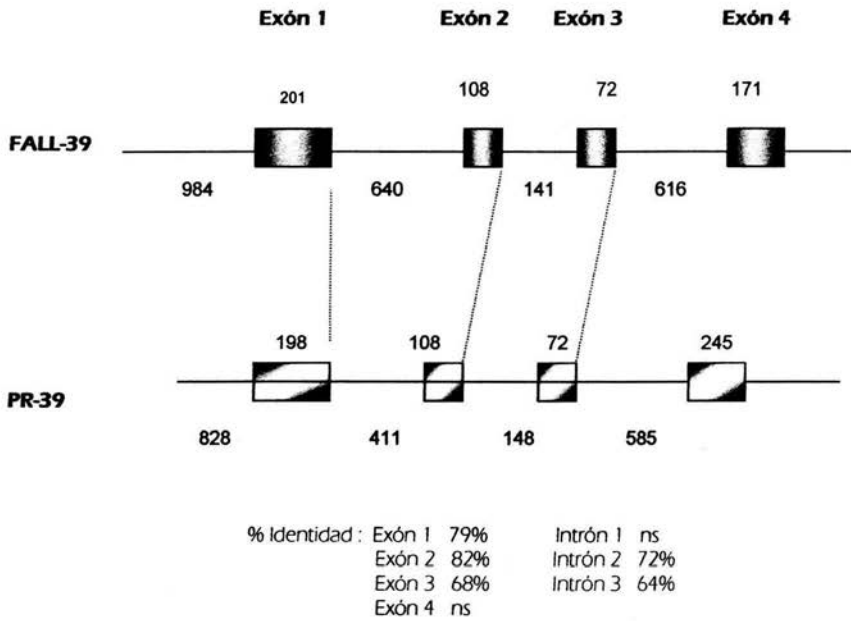


Figura 2. Comparación de la organización del FALL-39 humano y del PR-39 porcino, ambos pertenecen a la familia de las catelicidinas. Los número indican pares de bases (pb). La identidad al nivel de nucleótidos entre diferentes partes de los dos genes se muestra en esta figura (Tomado de Agerberth *et al*, 1995).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

GEN Y PLÁSMIDO UTILIZADO

El gen *hsp60Sp* que codifica para la HSP60Sp fue clonado en el fago lambda M49 a partir de una biblioteca genómica de *S. pyogenes* por el Dr. Andreas Podbielski (Inst. Med. Mikrobiol., FDR). Posteriormente este gen (que se encontraba en un fragmento de DNA de aproximadamente 1650 pb) se subclonó por PCR, por el mismo autor; en el sistema de expresión del vector pMALc-2 de 6646 pb de *New England Biolabs*. A partir del plásmido *pMALc-2::hsp60Sp* donado por el Dr. Podbielski, el gen *hsp60Sp* se subclonó por segunda vez en el vector pPROEX-HTa (Ruiz-González, 2000). A este nuevo plásmido se le nombró pHSP60Sp.

INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

El plásmido pHSP60Sp se empleó para transformar a una cepa de *Escherichia coli* XL-1 Blue, la cual se trató con cloruro de calcio 0.1 M, para pasarla en estado de competencia para adquirir el plásmido. La transformación bacteriana se realizó a 4°C durante 30 minutos en un baño de hielo. Posteriormente se dió un choque térmico a 90 s a 42°C. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (50 µg/mL), y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Cada una de las colonias que contenían al plásmido recombinante, se pasó, con la ayuda de un palillo de madera estéril, a un tubo con 5.0 mL de medio líquido LB con ampicilina a una concentración final de 50 µg/mL y se incubó en agitación a 37°C durante 12 horas. Este cultivo sirvió para inocular un matraz con 100 ml de medio LB con ampicilina a la misma concentración. Este cultivo se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una absorbencia de 0.4 a 0.6 a 640 nm. Con la finalidad de inducir la expresión de los genes de las proteínas recombinantes, se agregó IPTG (Isopropil-β-D-

tiogalactopiranosido, *Research Organics Inc.*), a una concentración final de 0.6 mM y se incubó en agitación durante 4 h más a 37°C.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos y se desechó el sobrenadante, obteniéndose así el paquete celular. Una alícuota de 1.0 mL de cultivo se analizó en PAGE-SDS al 12.5% para corroborar la inducción de la proteína recombinante.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

La purificación de la proteína recombinantes se realizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor de la resina Ni-NTA (*QIAGEN*). El sistema de expresión procariótico pPROEX-HT de *Life Technology* utilizado en este estudio, presenta la característica de expresar la proteína recombinante fusionada a una secuencia de 6 histidinas las cuales presentan una fuerte afinidad a una resina matriz de níquel, por lo que se utilizó este sistema para la purificación de la proteína recombinante.

Una vez que se comprobó la inducción de la proteína recombinante, el paquete bacteriano se resuspendió en 4.0 mL de regulador de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 1mM, pH 8.0 – 8.5) y se sonicó a 180 W en un baño de hielo, durante 30 minutos a intervalos de 5 minutos de reposo y un minuto de sonicado con pulsos. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 5000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante rico en proteínas recombinantes se mezcló con la resina (Ni-NTA agarose, *QIAGEN*), la cual se lavó previamente con regulador de lisis.

La mezcla se incubó en un baño de hielo durante 1 h en agitación constante y se empleó para cargar una jeringa de 3.0 mL, que funcionó como una columna. Las proteínas que no interaccionaron con la resina se eliminaron en el efuente al vaciar la mezcla en la columna. Posteriormente se llevaron a cabo los lavados con 8.0 – 10.0 mL de regulador de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, 10% de glicerol, pH 8.0 – 8.5), para la eliminación de las proteínas que no se unieron a la resina.

Para eluir la proteína recombinante correspondiente se utilizaron fracciones de 500 μ L de regulador de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, 10% de glicerol, pH 8.0 – 8.5). La presencia de proteínas en las fracciones recuperadas durante la lisis, el lavado y la elusión se analizaron en PAGE-SDS al 12.5% y se cuantificó la concentración de la misma por el método de Bradford (1976).

LÍNEA CELULAR RAJI

La línea celular Raji se cultivó en medio RPMI-1640 (*Sigma*) suplementado con suero fetal bovino (*Gibco*) al 5% y gentamicina (*Gibco*) a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 5% de CO_2 . Se determinó primeramente el número de células para detectar la expresión de los genes angiogénicos.

ENSAYO DE ESTIMULACIÓN

Las células Raji se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado como se indicó anteriormente. Un día antes de realizar el ensayo, las células se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI-1640 sin suero y sin antibiótico. Al día siguiente, se ajustaron las células a 3 millones en un volumen de 500 μ L en tubos estériles de 5 mL. Las células se estimularon con 1 μg de rHSP60Sp y con 100 ng/mL de LPS. También se realizaron ensayos con polimixina B (PmB) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para bloquear el efecto del LPS. En el caso de la PmB se adiciona una hora antes del estímulo. Las células se estimularon a los tiempos de 0, 3, 6 y 9 hrs. Transcurridos estos tiempos, se obtuvo el RNA total de las células y después se procedió a realizar el RT-PCR.

OBTENCIÓN DE RNA TOTAL

Transcurrido el tiempo de estimulación, las células se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se les adicionó Trizol (*Gibco BRL, Life Technologies*), éstas se

homogenizaron en Trizol para la obtención del RNA total y se procedió de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. El botón de RNA se disolvió en agua libre de RNAsa (agua DEPC) y la cantidad de RNA se determinó por espectrofotometría a 260 nm. La integridad del RNA total se analizó en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

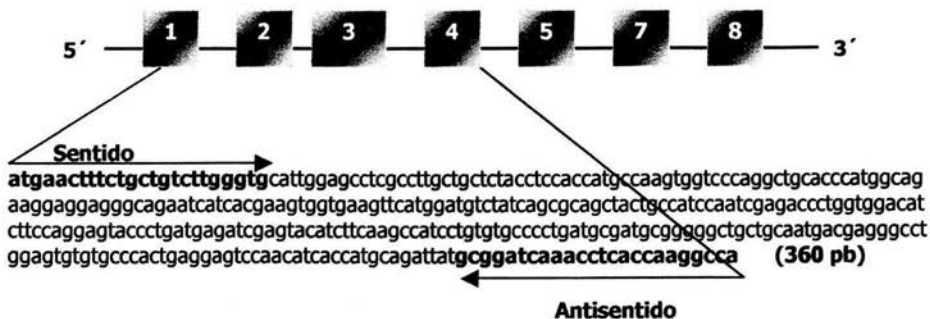
TRASCRIPTASA REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

Reacción de RT. El cDNA se sintetizó en 20 μ l de reacción que contenga 3 μ g de RNA total, 500 μ M de desoxinucleótidos trifosfato, DTT 10 mM, oligonucleótido pdT₁₂₋₁₈ a 2.5 μ M, regulador de la primera cadena 1X y MMLV *Reverse Transcriptase* 200 U (Gibco). Las reacciones se incubaron por 1 h a 42 °C.

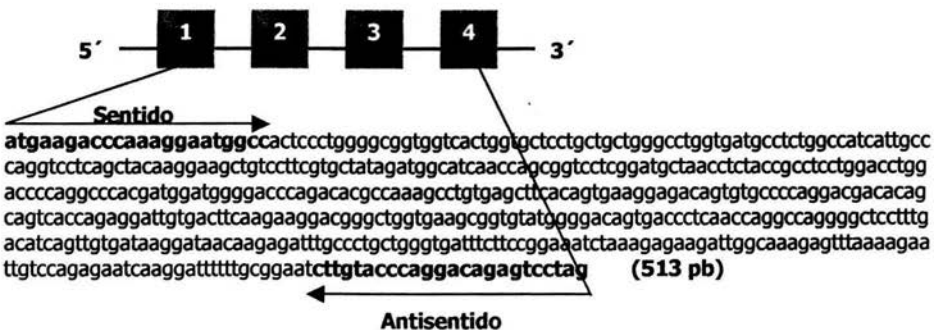
PCR. Antes de realizar la PCR con los iniciadores diseñados para amplificar los genes angiogénicos; se ajustó la cantidad de cDNA de cada una de las muestras. Esto se realizó con una RT-PCR para la β -actina, hasta lograr obtener la misma intensidad de la banda amplificada en todas las muestras. La PCR se realizó en un volumen total de 25 μ l; con los oligonucleótidos específicos a una concentración de 25 μ M, específicos para cada gen por amplificar, 3 μ l de la reacción de cDNA (según el resultado de la expresión del la β -actina), regulador PCR 1X, MgCl₂ 2 mM y TaqDNA polimerasa 1 U. La reacción se incubó en un termociclador a 92 °C por 5 min seguido de 35 ciclos a 92°C por 30 s; 57°C por 50s y 72°C por 40 s. Finalmente la reacción se mantuvo a 72°C por 5 min y después a 4 °C. Los fragmentos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Para evaluar la expresión de mRNA de la β -actina para normalizar la cantidad de cDNA. La intensidad de la banda amplificada se midió en un aparato de Imager Ready (Alpha Innotech Corporation) para obtener la relación FALL-39 o VEGF/ β -actina.

Los iniciadores para el gen FALL39 fueron: 5'- ATG AAG ACC CAA AGG AAT GGCC -3' y 5'- TTT GCC CTG CTG GGT GAT TTTC -3', dando un producto esperado de 513 pb. Para el gen VEGF: 5'- ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GGTG-3' y 5'-TGG CCT TGG TGA GGT TTG ATCC-3', dando un producto esperado de 360 pb. Se amplificó el gen de la β -actina con los iniciadores 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' y 5'-CTCCTTAATTGTCACGCACGATTTC-3', dando un producto de 550 pb. En la figura 3 se muestra la secuencia y el diseño de éstos iniciadores.

Exones del gen de VEGF



Exones del gen del FALL-39



Exones del gen de la beta-actina

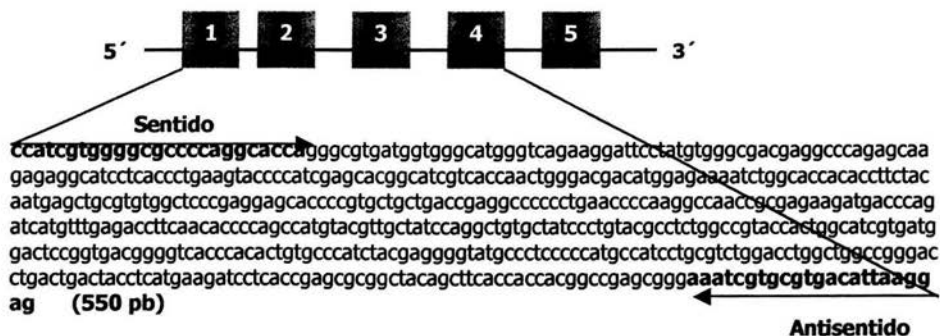


Figura 3. Diseño y secuencia de iniciadores

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

INDUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Como el objetivo de este trabajo fue el de estudiar la estimulación de la línea celular Raji frente a la proteína de choque térmico recombinante de 60 kDa de *Streptococcus pyogenes* (rHSP60Sp), entonces fue necesario la expresión y purificación de ésta proteína. Para esto, se realizó la inducción de la síntesis (con IPTG) de ésta proteína en la cepa de *E. coli* donde se encontraba el gen donado en un plásmido. Una vez comprobada la inducción de la proteína recombinante, se procedió a su purificación mediante la columna de Ni-NTA (QIAGEN). En la figura 4 se muestra el análisis de pureza de la rHSP60Sp en un PAGE-SDS al 12.5%.

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO ÓPTIMO DE CÉLULAS PARA ANALIZAR LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ANGIOGÉNICOS

En la figura 5 se muestran los RNA totales de las células Raji obtenidos de 1, 3 y 5 millones de células. Primero se ajustó la cantidad de cDNA de cada ensayo realizado. Esto se realizó con una RT-PCR con los iniciadores específicos para la β -actina, dando una banda amplificada de 550 pb. Estos resultados se muestran en la figura 6. Se probaron 3 μ L de cDNA y 3 μ L de una dilución 1:20. Como podemos observar la cantidad adecuada fue de 3 μ L de cDNA sin diluir; esto se realizó con los cDNA de 1, 3 y 5 millones.

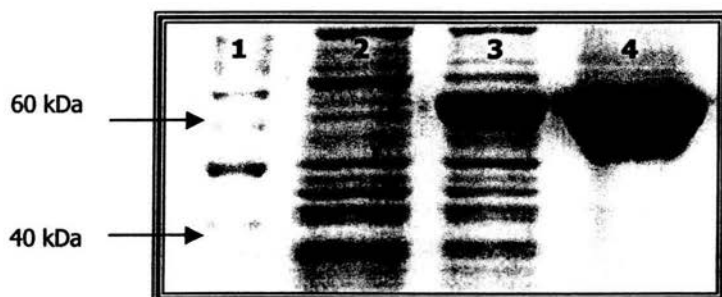


Figura 4. Análisis de pureza de la proteína recombinante (rHSP60Sp) en PAGE-SDS al 12.5%. Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 proteína de choque térmico sin IPTG; carril 3, proteína de choque térmico inducida y carril 4 rHSP60Sp purificada.

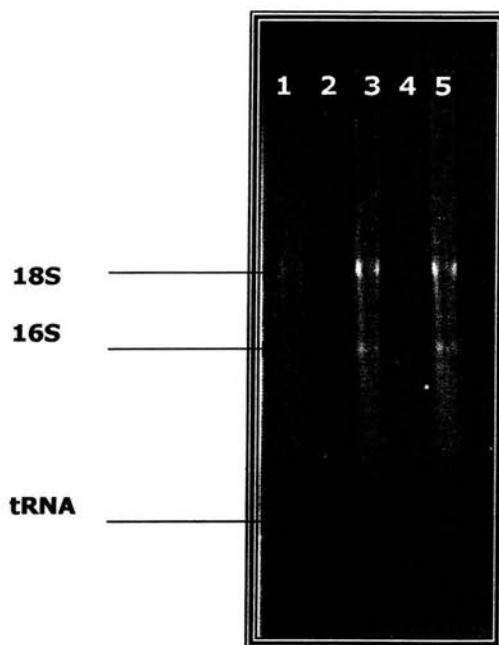


Figura 5. Obtención del RNA total. En el primer carril se muestra el RNA total de 1 millón de células, en el carril 3 se muestra el RNA total de 3 millones de células y en el carril 5 se muestra el RNA total de 5 millones de células. En todos los casos podemos observar las dos bandas características de 16S y 18S del RNA ribosomal y el RNA de transferencia. Esto se realizó en un gel de agarosa al 1%.

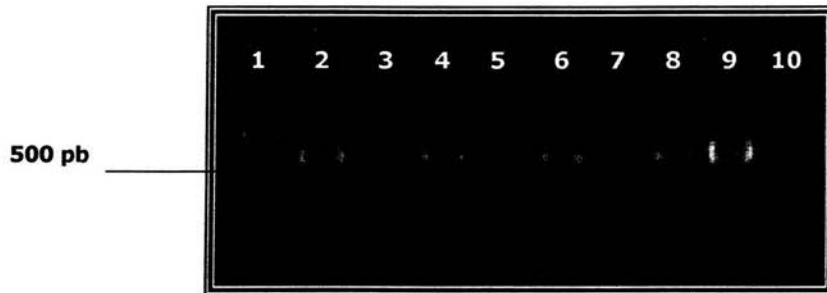


Figura 6. Estandarización del RT-PCR con β -actina. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pb, en los carriles 2,4, 6 se muestran 1, 3 y 5 millones de cDNA sin diluir respectivamente; en los carriles 3, 5 y 7 la dilución 1:20 de los respectivos cDNAs. En el 9 control positivo (un reamplificado positivo) y en el carril 10, el control negativo (sin cDNA, en su lugar se agregan 3 μ L de agua grado inyectable).

ENSAYO DE ESTIMULACIÓN

Para realizar el análisis de la expresión de los genes FALL-39 y VEGF en las células Raji estimuladas con la rHSP60Sp y LPS, primero se ajustó la cantidad de cDNA de cada ensayo realizado. Esto se realizó con una RT-PCR con los iniciadores específicos para la β -actina, dando una banda amplificada de 550 pb. El criterio de ajuste fue de que todas las muestras presentarían la misma intensidad de la banda.

La cantidad adecuada de células fueron 3 millones, después se procedió a determinar el tiempo óptimo de estimulación. Para ello se colocaron en tubos estériles 3 millones de células en 500 μ L a 4 tiempos diferentes: 0, 3, 6, y 9 horas de estimulación. En cada tiempo se tenían 3 tubos con las siguientes condiciones: el primer tubo era el testigo (sin estímulo), el segundo se estimuló con la rHSP60Sp y el tercero con el LPS. Los resultados se muestran en la figura 7. Como se observa en ésta figura, el LPS indujo una sobreexpresión de FALL-39 a las 0, 3 y 9 horas (figura 7; panel B, carriles 4, 7 y 13). En el caso de la proteína de choque térmico, se observó una ligera sobreexpresión de este gen a las 6 hrs de estimulación (figura 7; panel B, carril 8). No se observó un cambio en la expresión de VEGF con éstos estímulos (figura 7, panel C,).

De acuerdo con los resultados anteriores, se decidió agregar polimixina B (PmB) una hora antes de agregar los estímulos en los cuatro tiempos ensayados, para eliminar la posible presencia de endotoxina que pudiera inducir la expresión de éstos genes; y a su vez, el efecto del LPS en sí. Los resultados se muestran en la figura 8. Como era de esperarse, la PmB disminuyó las intensidades de las bandas en el caso de FALL39 y VEGF de todos los ensayos (figura 8: paneles A, B y C, carriles 3, 5, 7, 9, 11 y 13; tabla). En el caso las células estimuladas con el LPS, esta disminución fue más notoria (figura 8: paneles A, B y C, comparar carriles 10 y 11; tabla). Pero con la HSP60Sp, no se observó esta disminución en ambos genes (paneles B y C, comparar carriles 8 y 9). Esto indica que la HSP60Sp está induciendo la expresión de FALL-39 y VEGF. En el tiempo de 9 hrs se observó una marcada disminución de la expresión de los genes (figura 8: paneles B y C; carriles 12 y 13; tabla).

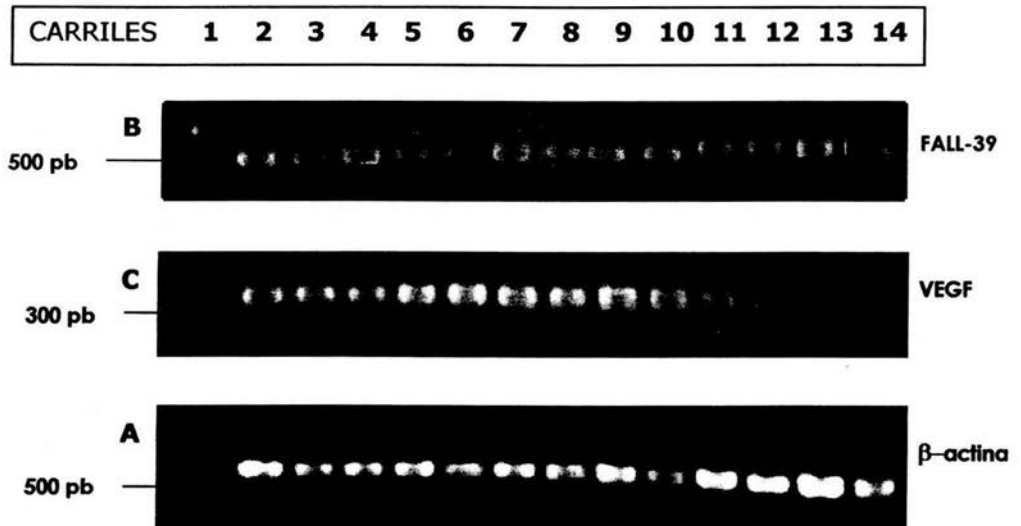
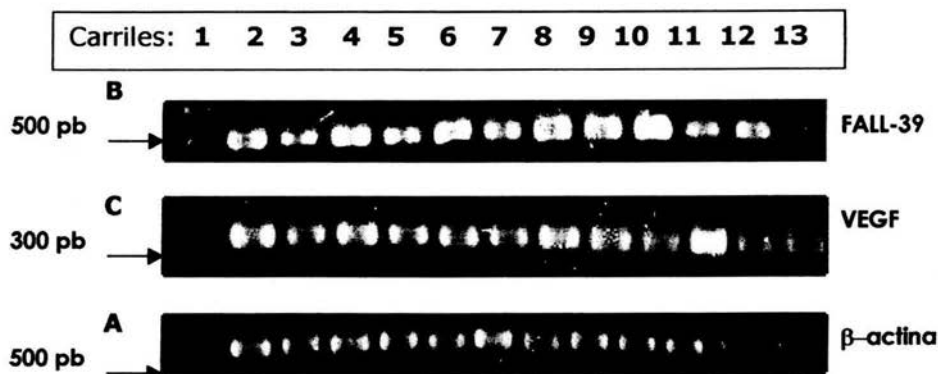


Figura 7. Análisis de la expresión del mRNA de FALL-39, VEGF y β-actina en la línea celular Raji por RT-PCR. Panel A: β-actina, panel B: FALL-39 y panel C: VEGF. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Testigo a 0 hrs, carril 3: rHSP60Sp a 0 hrs, carril 4: LPS a 0 hrs, carril 5: Testigo a 3 hrs, carril 6: rHSP60Sp a 3 hrs, carril 7: LPS a 3 hrs, carril 8: Testigo a 6 hrs, carril 9: rHSP60Sp a 6 hrs, carril 10: LPS a 6 hrs, carril 11 Testigo a 9 hrs, carril 12: rHSP60Sp a 9 hrs, carril 13: LPS a 9 hrs, y carril 14: control positivo de la PCR.



	CARRILES											
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
F/A	1.032	0.955	1.082	0.958	1.180	0.896	1.294	1.17	1.4	1.062	1.013	0.939
V/A	0.938	0.733	0.848	0.742	0.879	0.738	0.991	0.897	0.862	0.793	0.703	0.697

Figura 8. Análisis de la expresión del mRNA de FALL-39, VEGF y β-actina, en la línea celular Raji por RT-PCR. Panel A: β-actina, panel B: FALL-39 y panel C: VEGF. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Testigo a 0 hrs, carril 3: Testigo + PmB a 0 hrs, carril 4 Testigo a 3 hrs, carril 5: Testigo + PmB a 3 hrs, carril 6: Testigo a 6 hrs, carril 7: Testigo + PmB a 6 hrs, carril 8: rHSP60Sp a 6 hrs, carril 9: : rHSP60Sp + PmB a 6 hrs, carril 10: LPS a 6 hrs, carril 11: LPS + PmB a 6 hrs, carril 12: testigo a 9 hrs, carril 13: testigo + PmB 9 hrs. En la tabla se muestran las relaciones FALL-39/β-actina (F/A) y VEGF/β-actina (V/A). Primero, en el aparato *Imager ready* (Alpha Innotech corporation) se mide la intensidad de la banda amplificada en pixeles / unidad de área para β-actina, FALL-39 y VEGF. En cada caso, a cada valor se le resta el fondo. Después, se realiza una relación entre FALL-39/β-actina (F/A) y VEGF/β-actina (V/A).

En la psoriasis ocurren tres fenómenos muy importantes: la hiperproliferación de queratinocitos, el aspecto inmunológico y la angiogénesis. Actualmente se desconoce el antígeno desencadenante de esta dermatosis, pero se sabe que antígenos del *Streptococcus pyogenes* pueden estimular linfocitos T de pacientes con psoriasis.

Como se mencionó anteriormente la angiogénesis es la generación de nuevos vasos sanguíneos (81). La angiogénesis es un fenómeno que en condiciones normales se encuentra en equilibrio, regulado por diversas moléculas estimuladoras e inhibitoras (factores angiogénicos y factores antiangiogénicos). Los factores angiogénicos más importantes son TGF- α y HIF-1 α ; ambos inducen la expresión de VEGF por vías diferentes. El VEGF es el principal inductor de la formación de nuevos vasos sanguíneos. Dentro de los factores antiangiogénicos están la trombospodina-1 y -2, el factor plaquetario 4, inhibidores de las metaloproteinasas, la angiostatina, el TGF- β y las proliferinas placentarias. Estos inhibidores de angiogénesis son expresados en la piel normal y mantienen la integridad de los vasos sanguíneos de la piel (20). Los retinoides son compuestos que se han utilizado en el tratamiento de varias enfermedades de la piel, entre ellas la psoriasis, y se ha observado que inhiben la secreción de VEGF en cultivos primarios de queratinocitos (97).

Se han detectado nuevos inhibidores de la angiogénesis. Desde 1996 se ha detectado que las células de carcinoma renal expresan grandes cantidades de VEGF, posiblemente por una mala función del gen supresor de tumor llamado *von Hippel Lindau* (VHL). Cuando éstas células se transfectaron, con el gen normal de VHL de una persona sana, los niveles de expresión de VEGF disminuyeron (39, 58, 90). Se ha descrito que VHL es una subunidad del complejo multiprotéico asociado al proceso de actividad del E3 ubiquitin ligasa, la cual puede activar la ubiquitinación de HIF-1 α para su degradación y, por lo tanto, de esta forma se suprime la expresión de VEGF (51). Un año después, se reportó una nueva proteína llamada inhibidor de HIF-1 α (HIF1 AN), que interacciona con HIF-1 α y VHL para reprimir la actividad transcripcional del HIF-1 α . El N-terminal de HIF1 AN interacciona con el N-terminal de VHL y ambos interaccionan con HIF-1 α en diferentes sitios (VHL con TAD-N de HIF-1 α) para formar un complejo ternario. Este complejo funciona como un co-receptor de HIF-1 α , por que VHL pero no HIF-1 AN interacciona con

HDAC1, HDAC2 y HDAC3, las cuales se encuentran reclutadas en el sitio (59). Al transfectar el gen HDAC1 en células del endotelio humano para que éste se sobreexpresará, se observó una baja expresión de los genes p53 y VHL, y una sobreexpresión de los genes HIF-1 α y VEGF. Cuando éstas células se trataron con trichostatina A, el cual es un inhibidor del HDAC, se observó todo lo contrario. Por lo que se concluye que, la hipoxia aumenta la función de HDAC, y éste induce la angiogénesis por inhibir los genes supresores de tumor p53 y VHL (62).

Recientemente se tiene reportado que el péptido antimicrobiano PR39 del cerdo presenta una actividad angiogénica. El péptido homólogo del PR39 en el humano se llama FALL-39. FALL-39 es otra de las moléculas que actualmente se han involucrado en la regulación de la función de HIF-1 α . Como se mencionó anteriormente, HIF-1 α es degradado por el sistema de ubiquitinas y FALL-39 inhibe esta degradación (45). Esto sugiere que posiblemente la función de FALL-39 es contraria a la función que presenta el VHL en el fenómeno de la angiogénesis.

En nuestro grupo de investigación se encontró que, al trabajar con biopsias de piel lesionada y no lesionada de pacientes psoriásicos, la expresión del mRNA de VEGF y FALL-39 solamente en la piel lesionada de los pacientes psoriásicos. En las biopsias de piel no lesionada y de sujetos sanos no encontró expresión de éstos genes. La expresión del mRNA de HIF-1 α se observó en casi todas las muestras de piel lesionada y no se detectó la expresión de éste gen en las biopsias de piel no lesionada de los mismos pacientes. En las biopsias de piel de sujetos sanos se detectó la expresión del HIF-1 α solamente en dos de las diez muestras analizadas (12). De igual manera, hemos demostrado que la HSP60Sp activa los linfocitos T de los pacientes psoriásicos (70).

Ye *et al*, 2003 demostraron que VEGF se expresa en las líneas celulares HL-60 y Raji (102). En el presente trabajo observamos que la HSP60Sp y el LPS inducen la expresión de FALL-39 y, que éste, modula la expresión de VEGF en la línea Raji. La expresión de VEGF también fue afectada por la PmB. Se observó que cuando la expresión de FALL-39 es mayor, también la expresión de VEGF es mayor. La expresión de VEGF también se mantuvo aumentada cuando las células fueron estimuladas con la HSP60Sp. Estos resultados indican que la expresión de VEGF en las células Raji podría deberse a la

endotoxina presente en el medio de cultivo; y que el LPS y la HSP60Sp aumentan la expresión de FALL-39 y, este controla positivamente la expresión de VEGF.

FALL-39 se ha detectado en su forma madura (como péptido LL-37) en la piel lesionada de pacientes con psoriasis, lupus eritematoso subcutáneo, dermatitis herpetiforme, dermatitis atópica e hipersensibilidad por contacto (34). Li *et al*, 2000 demostraron la actividad angiogénica del PR39 (57).

LL-37 es dos aminoácidos más corto de la región N-terminal que el FALL-39 y se le asignó ese nombre porque empieza con dos residuos de leucina y porque tiene 37 aminoácidos de longitud. LL-37 es producida por neutrófilos, células epiteliales, monocitos, células NK, linfocitos B y linfocitos T $\gamma\delta$. La proproteína de LL-37 también se le ha asignado el nombre de CAP18 humana (55). Además, hCAP18/LL-37 se expresa en testículos (1), epitelio escamoso de la boca, lengua, esófago, cervix y vagina (65). En este trabajo, encontramos que la HSP60Sp puede inducir la expresión de LL37 en la línea celular Raji.

En contraste con la defensinas, LL-37 es un péptido libre de cisteínas que adopta una conformación α -hélice anfipática. La preproteína pertenece a la familia de las catelicidinas. El común denominador de ésta familia de proteínas es una proregión sumamente conservada del tipo de catelina, mientras que el dominio C-terminal, es representado por una alta variedad de péptidos antibacterianos. El prepro-LL37 es la única catelicidina humana caracterizada. La actividad bactericida de éste péptido requiere la activación proteolítica de su precursor por enzimas tales como la proteinasa 3 (91).

Se ha reportado que LL-37 es quimiotáctica para, y puede inducir la movilización de Ca²⁺ en monocitos humanos. LL-37 es también quimiotáctica para neutrófilos humanos y linfocitos T, además se conoce que éstas células expresan FPRL-1 (receptor del formil-péptido tipo 1), que es el receptor del LL-37. Por lo que se sugiere que, el LL-37 contribuye a la inmunidad innata y adquirida ya que recluye neutrófilos, monocitos y linfocitos T a los sitios de invasión microbiana por su interacción con el FPRL-1 (99, 100). LL-37 fuera de la célula ejerce acciones protectoras contra la endotoxina, ya que bloquea

la unión del LPS con las células CD14⁺, así suprime la producción de citocinas por éstas células (65).

Recientemente, se ha demostrado que LL-37 induce la angiogénesis mediada por FPRL-1 expresado en células del endotelio. El péptido activa directamente a las células del endotelio, lo que resulta en un incremento en la proliferación y formación de estructuras tipo vaso en cultivos de células del endotelio. Por lo que se sugiere que, el LL-37/hCAP18 es un péptido antimicrobiano funcional que tiene un papel central en la inmunidad innata, ya que asocia la defensa del huésped y la inflamación con la angiogénesis y la arteriogénesis (53).

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Agerberth B., Gunne H., Odeberg J, *et al.* 1995. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is a cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *PNAS* **92**: 195-199.
2. Agerberth B., Charo J., Werr J., *et al.* 2000. The human antimicrobial and chemotaxis peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* **96**: 3086-3093.
3. Anand-Apte B. *et al.*, 1996. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol* **74**: 853-862.
4. Arenas R. 2000. Psoriasis. En: *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento.* McGraw-Hill: Interamericana. 415-422.
5. Asadullah K., Volk H-D., Sterry W. 2002. Novel immunotherapies for psoriasis. *TRENDS Immunol* **23** (1): 47-53.
6. Austin L-M-, Ozawa M., Kikuchi T., Walters I.B., Krueger J.G. 1999. The majority of epidermal T cells in psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining Tc1 (cytotoxic T lymphocyte) and Th1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* **113** (5): 18 - 25.
7. Baker B. S. y Fry L. 1992. The immunology of psoriasis. *Br J Dermatol* **126**: 1-9.

8. Bals R., Wang X., Zasloff M. y Wilson J. M. 1998. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad anti-microbial activity at the airway surface. *PNAS* **95**: 9541-9546.
9. Bals R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* **1**: 141-150.
10. Brown D.W., Baker B.S., Ovigne J.M., Hardman C., Powles A.V. y Fry L. 2000. Skin CD4+ T cells produce interferon-gamma in vitro in response to streptococcal antigens in chronic plaque psoriasis. *J Invest Dermatol* **114** (3): 576-580.
11. Cancino-Díaz J. C., Reyes-Maldonado E., Bañuelos-Pánuco C. A. *et al.* 2002. Interleukin-13 receptor in psoriatic keratinocytes: overexpression of mRNA and underexpression of the protein. *J Invest Dermatol* **119**: 1114 – 1120.
12. Cancino Gómez F. G. 2003. Estudio de la expresión de los genes que codifican para el FALL-39, VEGF y HIF-1 alfa en biopsias de pacientes con psoriasis. Tesis de Maestría. ENCB – IPN.
13. Carmeliet P. 2000. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**: 389-395.
14. Claffey K. P., Wilkinson W. O., Spiegelman B. M. 1992. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem* **267**: 29483-29488.
15. Cohen T., Nahari D., Cerem L. W. *et al.* 1996. Interleukin 6 induces the expression of VEGF. *J Biol Chem* **271**: 736-741.
16. Cowland J. B., Johnsen A. H., y Borregaard N. 1995. hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* **368**: 173-176.

17. Christophers E., Henseler T. Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* **279** Suppl: S48-S51.
18. Debets, R., Hegmans J.P.J.J., Troost K.J.J., Benner R., Prens E.P. 1995. Enhanced production of biologically active interleukin-1 α and interleukin-1 β by psoriatic epidermal cells *ex vivo*: evidence of increased cytosolic interleukin-1 β levels and facilitated interleukin-1 release. *Eur J Immunol* **25** (6): 1624-1630.
19. Detmar M., Brown L. F., Claffey K. P. *et al.* 1994. Overexpression of vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* **180**: 1141-1146.
20. Detmar M. 2000. The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J Dermatol Sci* **24**: S78 – S84.
21. DiSepio D., Chandraratna R. A. S. y Nagpal S. 1999. Novel approaches for the treatment of psoriasis. *Drugs Discovery Today* **4** (5): 222-231.
22. Dorschner R. A., Pestonjamas V. K., Tamakuwala S. *et al.* 2001. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A Streptococcus. *J Invest Dermatol* **117**: 91-97.
23. Elder, J.T., Fischer G.J., Lindquist P.B., Bennett G.L., Pittelkow M.R., Coffey R.J., Ellingsworth L., Derynck R., Voorhees J.J. 1989. Overexpression of Transforming Growth Factor α in psoriatic epidermis. *Science* **243**: 811-814.
24. Ferrara N. 1993. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med* **3**: 244-250.
25. Ferrara N. y Davis-Smith T. 1997. The biology of Vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18** (1): 4-25.

26. Ferrara N. 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: C1358-C1366.
27. Ferrara N., Gerber H. P. y LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9** (6): 669-676.
28. Finch P.W., Murphy F., Cardinale Y. y Krueger J.G. 1997. Altered expression of keratinocyte growth factor and its receptor in psoriasis. *Am J Pathol* **151**: 1619-1628.
29. Folkman J. y Klagsbrun M. 1987. Angiogenic factors. *Science* **235**: 442 – 447.
30. Folkman J. 1991. What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? *J Natl Cancer Inst* **82**: 4-6.
31. Folkman J. y Shing Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem* **267**: 10931-10934.
32. Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* **1**: 27-31.
33. Frank S., Hubner G., Breier G. *et al*, 1995. Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* **270**: 12607-12613.
34. Frohm M., Agerberth B., Ahangari G. *et al*. 1997. The expression of the gene coding for the antimicrobial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* **272**: 15258-15263.
35. Gallo R. L., Murakami M. y Ohtake T. 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J Allergy Clin Immunol* **110**: 823-831.
36. Ganz T. y Lehrer R. I. 1998. Antimicrobial Peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* **10**: 41-44.

37. Gerber H. P. y Ferrara N. 2003. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis *J Mol Med* **81**: 20-31.
38. Giasuddin A. S., El-Sherif A., El-Ojali S. 1998. Prolactin: does it have a role in the pathogenesis of psoriasis? *Dermatology* **197**: 119-122.
39. Gnarr J. R., Zhou S., Merrill M. J. *et al.* 1996. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of VHL tumor suppressor gene. *PNAS* **93**: 10589 – 10594.
40. Gniadecki R. 1998. Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen Pharmac* **30** (5): 619- 622.
41. Grossman, R.M., Krueger J., Yourish D., Granelli-Piperno A., Murphy D.P., May L.T., Kupper T.S., Sehgal P.B., Gottlieb A.B. 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *PNAS* **86** (16): 6367-6371.
42. Gudmundsdóttir A.S., Sigmundsdóttir H., Sigurgeirsson B., Good M.F., Valdimarsson H., Jonsdóttir I. 1999. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin Exp Immunol* **117** (3): 580-586.
43. Gudmundsson G. H., Agerberth B., Odeberg J., *et al.* 1996. The human gene FALL-39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* **238**: 325-332.
44. Gudmundur H., Gudmundsson G. H., Kristinn P. *et al.* 1995. Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene family member: Comparative mapping of the locus for the human peptide antibiotic FALL-39. *PNAS* **92**: 7085 – 7089.

45. Guillermin K. y Krasnow A. M. 1997. The hypoxic response: HIFing and HIFing. *Cell* **89**: 9 – 12.
46. Harder J., Bartels J., Christophers E. et al. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**: 861.
47. Hiraoka N., Allen E., Appel I.J. et al, 1998. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* **95**: 365-377.
48. Horiuchi N., Aiba S., Ozawa H., Sugawara S., Rikiishi H., Kumagai K., Tagami H. 1998. Peripheral blood lymphocytes from psoriatic patients are hyporesponsive to b-streptococcal superantigens. *Br J Dermatol* **138**: 229-235.
49. Houck K.A. et al, 1991. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing RNA. *Mol Endocrinol* **5**: 1806-1814.
50. Huang H. J., Ross C. R., y Blecha F. 1997. Chemoattractant properties of PR39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol. Supplement* 20000, **18** (N 50).
51. Kamura T., Sato S., Iwai K. et al. 2000. Activation of HIF alfa ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *PNAS* **97**: 10430 – 10435.
52. Klagsbrun M. y D'Amore P.A. 1991. Regulators of angiogenesis *Annu Rev Physiol* **53**: 217-239.
53. Koczulla R., Degenfeld G., Kupatt C., et al. 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP18. *J Clin Invest* **111** (11): 1665-1672.

54. Konstantinova N. V., Duong D. M., Remenyik E., Hazarika P. 1996. Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in those derived from fibroblasts. *J Invest Dermatol* 107: 615 – 621.
55. Larrick J. W., Hirata M., Balint R. F. *et al*, 1995. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* 63: 1291 – 1297.
56. Leung D. W., Cachianes G., Kuang W.J. *et al*, 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309.
57. Li J., Post M., Volk R. *et al*. 2000. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 6 (1): 49-56.
58. Lliopoulos O., Levy A. P., Jiang C. 1996. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *PNAS* 93: 10595 – 10599.
59. Mahon P. C., Hirota K., Semeza G. L. 2001. HIF-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15: 2675 – 2686.
60. Melder R. J., Koenig G. C., Witwer B. P. *et al*. 1996. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med* 2: 992-997.
61. Minchenko A., Bauer T., Salceda S. y Caro J. 1994. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression *in vivo* and *in vitro*. *Lab Invest* 71: 374-379.
62. Myoung K. S., Kwon J. H., Lee Y. M. 2001. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Med* 7: 437 – 443.

63. Nagaoka I., Hirota S., Niyonsaba F., et al. 2001. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD14⁺ cells. *J Immunol* **167**: 3329 – 3338.
64. Nickoloff B.J. 1999. The Immunologic and Genetic Basis of Psoriasis. *Arch Dermatol* **135** (Sep): 1104-1110.
65. Nilsson M. F., Sandstedt B., Sorensen O., et al. 1999. The human cationic antibacterial protein (Hcap18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with IL-6. *Infect Immun* **67**: 2561 - 2566.
66. Nilsson M., Sandstedt B., Sorensen O. et al. 1999. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with IL-6. *Infect Immun* **67**: 2561-2566.
67. Norris D.A. Travers J.B., Leung D.Y.M. 1997. Lymphocyte Activation in the Pathogenesis of Psoriasis. *J Invest Dermatol* **109** (1): 1-4.
68. Ortíz-Quintero B. 1997. Identificación de antígenos del *Streptococcus puogenes* relacionados con la psoriasis guttata. Tesis de Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunología. ENCB-IPN.
69. Ortonne 1999. Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol* **140** (S54): 1-7.
70. Pablo Velázquez A. M. 2003. Estudio de la activación de linfocitos T de pacientes con psoriasis frente a polipéptidos recombinantes de la proteína de choque térmico de 60 kDa de *Streptococcus pyogenes* (HSP60Sp). Tesis de Maestría. ENCB – IPN.
71. Pepper M. S., Ferrara N., Orci L. y Montesano R. 1992. Potent synergism between vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis *in vitro*. *Am J Pathol* **145**: 1023-1029.

72. Pepper M. S., Montesano R., Mandriota S.J. *et al*, 1996. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein* **49**: 138-162.
73. Pérez-Lorenzo R. 2000. Respuesta celular a proteínas de choque térmico de *Streptococcus pyogenes* en la psoriasis. Tesis Doctoral. ENCB-IPN.
74. Pérez-Lorenzo R., Zambrano-Zaragoza J.F., Saul A., Jiménez-Zamudio L., Reyes-Maldonado E., García-Latorre E. 1998. Autoantibodies to autologous skin in guttate and plaque forms of psoriasis and cross-reaction of skin antigens with streptococcal antigens. *Int J Dermatol* **37** (7): 524-531.
75. Prinz J.C. 1999. Which T cells cause psoriasis? *Clin Exp Dermatol* **24** (4): 291-295.
76. Qi J.H., Ebrahim Q., Moore N. *et al*, 2003. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nature Med* **9** (4): 407-415.
77. Ramírez-Reséndiz . 2001. Estudio inmunológico de pacientes con psoriasis frente a la HSP70 recombinante de *Streptococcus pyogenes*. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.
78. Ruiz-González V. 2000. Respuesta humoral a rHSP60Sp del *Streptococcus pyogenes* en pacientes con psoriasis. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.
79. Sánchez Becerra M. 2002. Obtención de polipéptidos recombinantes de la proteína de choque térmico de 60 kDa de *Streptococcus pyogenes*. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.
80. Sánchez-Huerta, J. L. 2002. Reacción cruzada entre la proteína de choque térmico de 60 kDa del *Streptococcus pyogenes* y los queratinocitos de pacientes psoriásicos. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.

81. Sánchez V. 2001. Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral. *Rev Cubana Invest Biomed* **20**: 223-230.
82. Schroder J. M., Harder J. 1999. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 645- 651.
83. Schultz, B.S., Michael G., Wagner S., Süß R., Beetz A., Peter R.U, Kernény L., Ruzicka T. 1993. Increased expression of epidermal IL-8 receptor in psoriasis down-regulation by FK506 *in vitro*. *J Immunol* **151** (8): 4399-4406.
84. Senger D. R., Galli S.J., Dvorak A. M. *et al* 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**: 983-985.
85. Shibuya M. 1995. Role of VEGF-Fit receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* **67**: 281-316.
86. Shibuya M., Ito N., Claesson-Welsh L. 1999. Structure and function of VEGF Receptor-1 and-2. *Curr Topics Microbiol Immunol* **237**: 59-83.
87. Shibuya M. 2001. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogénesis. *Cell Struc Funct* **26**: 25-35.
88. Shinnar A. E., Butler K. L. y Ju P.H. 2003. Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistence. *Bioorganic Chemistry* **31**: 425-436.
89. Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-iniciated angiogénesis. *Nature* **359**: 843-845.

90. Siemeister G., Weindel K., Mohrs K., Marme D. 1996. Endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* **56**: 2299 – 2301.
91. Sorensen O. E., Follin P., Johnsen A. H., *et al*, 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**: 3951-3959.
92. Takeshita S., Zheng L. P., Brogi E. *et al*. 1994. Therapeutic angiogenesis. *J Clin Invest* **93**: 662-670.
93. Tokura Y., Seo N., Ohshima A., Wakita H., Yokote R., Furukawa F., Takigawa M. 1999. Hyporesponsiveness of peripheral blood lymphocytes to streptococcal superantigens in patients with guttata psoriasis: evidence for systemic stimulation of T cells with superantigens released from focally infecting *Streptococcus pyogenes*. *Arch Dermatol Res* **291** (7-8): 382-389.
94. Valdimarsson H., Baker B.S., Jónsdóttir I., Powles A., Fry L. 1995. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* **16** (3): 145-149.
95. Villeda-Gabriel G., Santamaria-Cogollos L.C., Pérez-Lorenzo R., Reyes-Maldonado E., Saul A., Jurado-Santacruz F., Jiménez-Zamudio L., García-Latorre E. 1998. Recognition of *Streptococcus pyogenes* and skin autoantigens in guttata psoriasis. *Arch Med Res* **29** (2): 143-148.
96. Wallin R.P.A., Lundqvist A., Moré S.H., von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H.G. 2002. Heat shock proteins activators of the innate immune system. *TRENDS Immunol* **23** (3): 130-1135.

-
97. Weninger W., Rendl M., Mildner M., Tschachler E. 1998. Retinoids downregulate vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor production by normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **111**: 907-911.
98. Wrone-Smith T., Johnson T., Nelson B., *et al* 1995. Discordant expression of Bcl-x and Bcl-2 by keratinocytes *in vivo* and psoriatic keratinocytes *in vivo*. *Am J Pathol* **146**: 1079-1088.
99. Yang D., Chen Q., Schmidt A. P. *et al*, 2000a. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes and T cells. *J Exp Med* **192**: 1069-1074.
100. Yang D., Chertov O., Rosenberg H. F. *et al*, 2000b. Mobilization of various types of leukocytes by human granulocyte-derived antimicrobial proteins: identification of novel activities and/or receptors for defensins, cathelicidin and eosinophil-derived neurotoxin (EDN) *J Leukoc Biol Supplement* 2000: **20** (N 63).
101. Yang D., Chertov O. y Oppenheim J. J. 2001. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci* **58** (7): 978-989.
102. Ye J., Liu F. Q. y Wu Y. P. 2003. The expression of vascular endothelial growth factor and its receptor in hematopoietic malignant cell lines HL-60 and Raji. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **11** (4): 376-380.
103. Zanetti M., Gennaro R. y Romeo D. 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* **374**: 1-5.