

## I- INTRODUCCIÓN

*El endotelio vascular en mamíferos juega un importante rol en la regulación, mantenimiento y control de las funciones cardiocirculatorias a través de la producción y liberación de múltiples sustancias. Tiene acción antitrombogénica y su intervención es fundamental en la regulación vasomotora. Las células endoteliales actualmente son reconocidas como fuente productora de sustancias de acción autocrina y paracrina, que participan en la vasorregulación, la coagulación y la fibrinólisis. Estas células promueven la liberación de diversas sustancias, tales como el óxido nítrico, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio, la endotelina-1, factores de crecimiento y citoquinas.*

*El presente trabajo se ha centrado en el análisis de las endotelinas, péptidos descubiertos a mediados de los años ochenta, que pueden considerarse como los factores vasoconstrictores endógenos más potentes y de efecto más prolongado descritos hasta el momento. Estas moléculas son péptidos de 21 aminoácidos que, a pesar de haber sido estudiadas en profundidad, aún hoy no se han podido definir clara- y completamente sus roles fisiológicos.*

*Con el objetivo de aportar nuevos datos que permitan ayudar a profundizar la comprensión y dilucidación de estos roles, se desarrolló la siguiente tesis doctoral.*

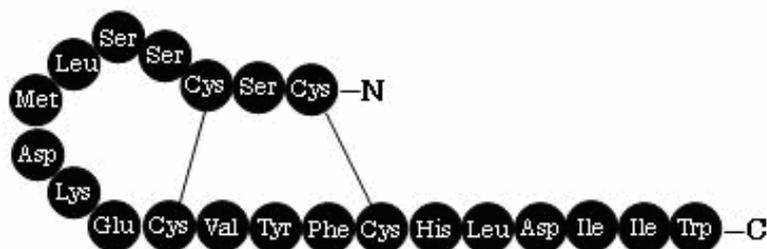
## **I.1- ENDOTELINAS EN HUMANOS**

### **I.1- a) Sistema Endotelina**

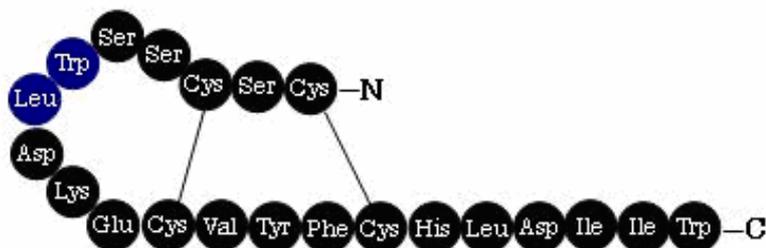
El primer reporte que determinó que las células endoteliales liberan un factor peptidérgico data del año 1985 (Hickey y col., 1985). En este trabajo se demostró que esta sustancia es capaz de producir una contracción sostenida en vasos aislados de arteriolas. Dicho factor fue, posteriormente, purificado y clonado trabajando con el sobrenadante de cultivos de células endoteliales de aorta porcina (Yanagisawa y col., 1988). Estos experimentos contribuyeron al inicio de numerosas investigaciones en un nuevo grupo de moléculas que recibieron la denominación genérica de endotelinas (ETs) o péptidos vasoconstrictores. Dicho sistema está formado por tres ligandos y dos receptores.

Estos péptidos, constituyen una familia de moléculas de las que al presente, se han descrito tres isoformas estrechamente relacionadas: Endotelina-1 (ET-1), Endotelina-2 (ET-2) y Endotelina-3 (ET-3) (Inoue y col., 1989). Las tres poseen 21 residuos de aminoácidos (aa), cuatro de los cuales son cisteínas (Cys), residuos responsables del establecimiento de un par de puentes disulfuro intramoleculares, que le dan una estructura semicónica (Fig. 1). Los efectos de estos ligandos son mediados por dos subtipos de receptores. Los puentes disulfuro y el dominio carboxilo terminal son críticos, tanto para la unión de las endotelinas con su receptor específico como para su actividad biológica (Sokolovsky, 1992).

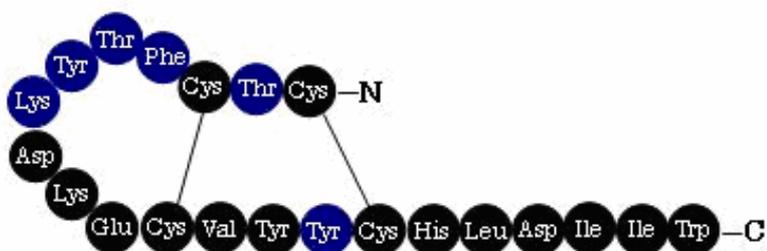
Las ETs están presentes en una amplia variedad de células y tejidos, con niveles de expresión variables, actuando como moduladores del tono vasomotor, de la proliferación celular y de la producción hormonal (Randall y col., 1989; Giannessi y col., 2001).



Endotelina-1 (Humanos, Cerdos, Ratones y Bovinos)



Endotelina-2 (Humanos, Cerdos y Ratones)



Endotelina-3 (Humanos, Cerdos, Ratas y Conejos)

**Figura 1:** Estructura y homología en la secuencia de aa de las endotelinas. Las esferas azules indican los aminoácidos en los que difieren respecto a la ET-1. (Modificado de Masaki, 2004).

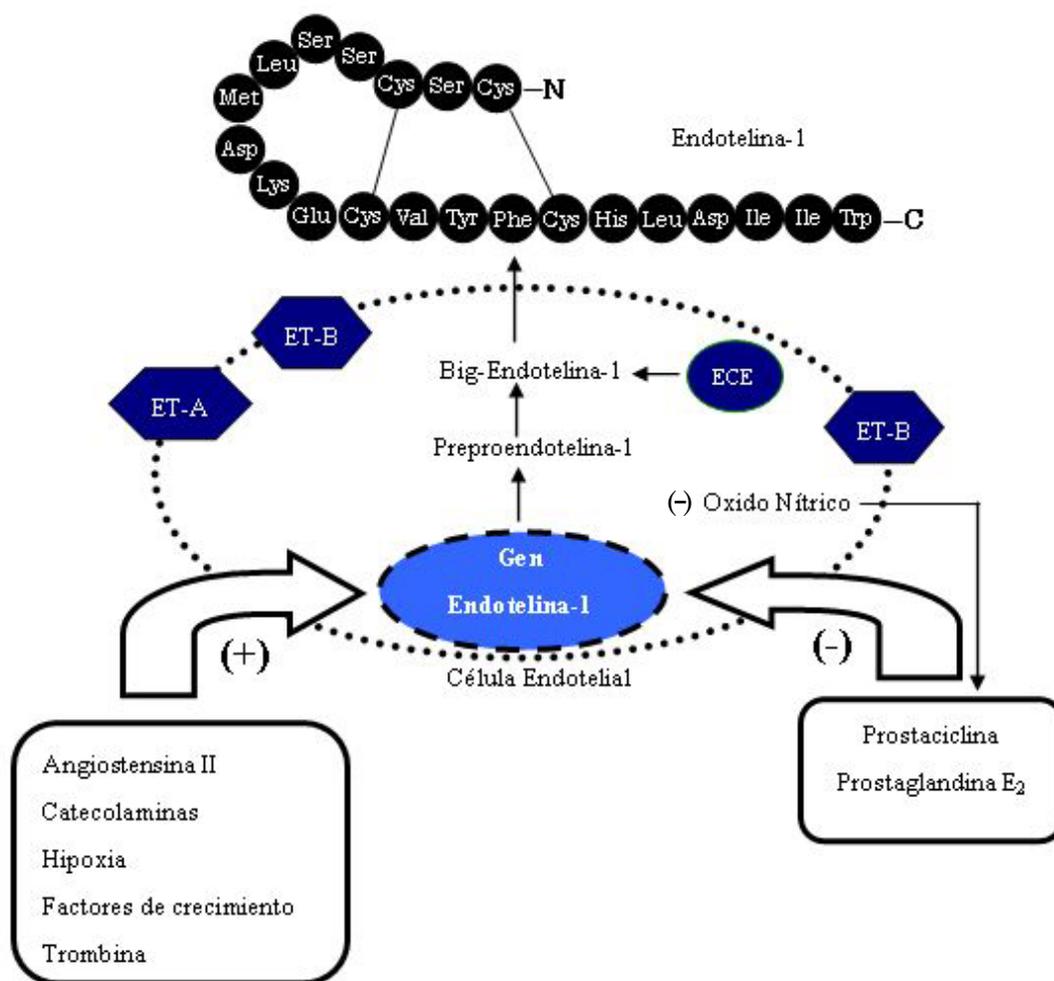
### I.1- b) Biosíntesis de las endotelinas

Las ETs son sintetizadas por distintos tipos celulares. La ET-1 es sintetizada fundamentalmente por células del endotelio (Yanagisawa y col., 1988), aunque también la producen las células del músculo liso vascular (Hahn y col., 1990; Lerman y col., 1991). La ET-1 es la isoforma más abundante y aparentemente la forma primordial de las tres estructuras peptídicas descritas al presente. Adicionalmente se sintetiza por las células epiteliales (Glassberg y col., 1994), las mesangiales (Fukunaga y col., 1991; Ergul, 2002), los leucocitos (Sessa y col., 1991), los macrófagos (Ehrenreich y col., 1990), los miocardiocitos (Ito y col., 1993; Thomas y col., 1996), las células de la glía, las neuronas y las células hepáticas (Emori y col., 1991). La ET-2 es producida primariamente en el riñón y en el intestino. También es producida por la placenta, el

útero y el miocardio. Finalmente, el tercer miembro de la familia, la ET-3, es la que exhibe el efecto vasoconstrictor más atenuado y es sintetizada principalmente en el cerebro, las vías digestivas y en menor proporción en los pulmones y el riñón.

En humanos cada uno de los péptidos (ET-1, ET-2, ET-3), es codificado por un gen independiente en los cromosomas 6, 1 y 20, respectivamente (Inoue y col., 1989). Las tres isoformas son sintetizadas como preprohormonas y posteriormente procesadas a péptidos activos. Asimismo, la vía metabólica para la activación biológica es similar en los tres isopéptidos. Se resume aquí, el proceso de la biosíntesis de la ET-1 por ser el mejor caracterizado. El ARN mensajero (ARNm) para la ET-1 humana codifica la preproendotelina (PPET) de 212 aa que a través de la acción proteolítica de una endopeptidasa es transformada en la Endotelina de 39 aa (*Big-ET-1*). Esta fracción posteriormente sufre la acción de la enzima convertidora de endotelinas (ECE-1), que es una metaloendoproteasa que rompe la unión en la posición triptófano 21 (Trp21) - valina 22 (Val22) produciendo el péptido bioactivo ET-1 de 21 aa (Levin, 1995; Galie y col., 2004) (Fig. 2). Se han identificado siete isoformas de ECE, siendo las más importantes la ECE-1 y ECE-2. La primera es una metaloendoproteasa de membrana, actúa tanto intra- como extracelularmente sobre la proendotelina (*Big-ET-1*). Por su parte, la ECE-2 actúa únicamente a nivel intracelular (Remuzzi y Benigni, 1993; Rubanyi y Polokoff, 1994).

La ET-1 no se almacena dentro de las células, sino que ante un estímulo, su síntesis es inducida en minutos y es secretada primariamente a través de una vía constitutiva. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que existe una vía regulada en la que el precursor se almacena en gránulos secretores (Hahn y col., 1990). La vía de secreción involucra al retículo endoplasmático rugoso, el aparato de Golgi, las vesículas del Golgi y pequeñas vesículas exocíticas ubicadas subyacentes a la membrana plasmática.



**Figura 2:** Síntesis de la Endotelina-1. Factores de estimulación e inhibición de la expresión de la ET-1. ET<sub>A</sub>: receptores para Endotelina A y ET<sub>B</sub>: receptores para Endotelina B (Modificado de Levin, 1995).

### I.1- c) Receptores de endotelinas

La respuesta inducida por las ETs puede ser dividida dentro de dos grandes grupos de acuerdo con el orden de potencia farmacológica de los tres isopéptidos. El primer grupo de respuesta incluye vasoconstricción, broncoconstricción, contracción del músculo liso uterino y secreción de aldosterona. El segundo grupo incluye vasorrelajación e inhibición de agregación plaquetaria dependiente de ET. En el primer grupo, ET-1 y ET-2 actúan como agonistas de mayor potencia que ET-3, mientras que en el segundo grupo los tres isopéptidos provocan respuestas de intensidad semejante.

Diferentes reportes, utilizando experimentos de reacción cruzada y estudios de unión con ETs marcadas en varios tejidos, proveen la evidencia bioquímica de la existencia de dos tipos de receptores de ETs de alta afinidad (Watanabe y col., 1989; Galron y col., 1991; Masaki, 2004).

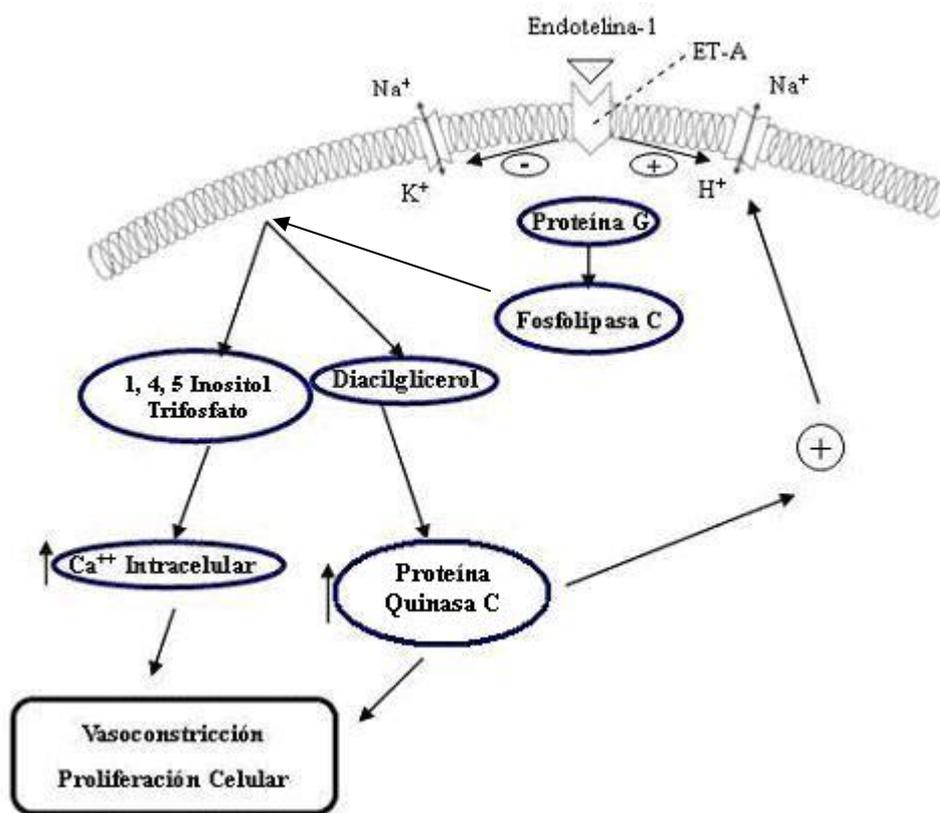
Su caracterización permitió determinar que éstos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, a través de los cuales son mediados los efectos de las ETs, ellos son los receptores para endotelina-A (ET<sub>A</sub>) y receptores para endotelina-B (ET<sub>B</sub>).

Los genes de los receptores de las ETs están presentes como copias simples en el genoma de diferentes especies: bovinos, porcinos, murinos y humanos (Hosoda y col., 1992; Mizuno y col., 1992; Arai y col., 1993; Cheng y col., 1993). En humanos, los genes de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> están localizados en los cromosomas 4 y 13 respectivamente (Hosoda y col., 1992; Arai y col., 1993). La secuencia de aminoácidos en los dos tipos de receptores posee una homología del 50%, y cada tipo está altamente conservado en diferentes especies de mamíferos (80% a 90%).

Los receptores tipo ET<sub>A</sub> poseen diez veces más afinidad por las ET-1 y ET-2 que por la ET-3 y se encuentran predominantemente sobre las células del músculo liso vascular y en los miocardiocitos. Son mediadores de procesos de vasoconstricción (Tabla I). La estimulación de estos receptores por la ET-1 activa la fosfolipasa C, la cuál induce incrementos del inositol-trifosfato, del diacilglicerol y del calcio intracelular provocando la contracción de las células de músculo liso (Rubanyi y Polokoff, 1994; Levin, 1995; Ergul, 2002). Los incrementos de diacilglicerol y de calcio también estimulan a la proteína quinasa C, la cuál actúa mediando la acción mitogénica de la ET-1 (Fig. 3).

Tabla I: Grados de afinidad de las ETs por sus receptores

Subtipos	Afinidad
ET <sub>A</sub>	ET-1 = ET-2 > ET-3
ET <sub>B</sub>	ET-1 = ET-2 = ET-3
ET <sub>C</sub>	ET-3 > ET-1 = ET-2



**Figura 3:** Mecanismos de acción sobre los receptores ET<sub>A</sub>. Esquema general de las vías de transducción de la ET-1 en el músculo liso. (Modificado de Levin, 1995).

Los receptores ET<sub>B</sub> se encuentran principalmente en las células endoteliales y en menor proporción, en las células del músculo liso. Poseen una afinidad comparable por todas las isoformas, también se han encontrado ampliamente distribuidos en el riñón, el hígado y el útero (Buchan y col., 1993; Pollock y Opgenorth, 1993; Pollock y Opgenorth, 1994). En menor cantidad, se han localizado, en el cerebro y sobre los astrocitos (Elshourbagy y col., 1992). La estimulación de los receptores ET<sub>B</sub> produce como respuesta principal la vasodilatación mediada por el incremento de la producción de óxido nítrico (ON) y prostaciclina (Miller y col., 1989; Moreland y col., 1994), sin embargo algunos autores reportan también una respuesta vasoconstrictora (Emori y col., 1990; Bigaud y Pelton, 1992; Clozel y col., 1992; Cristol y col., 1993). Las diferencias existentes en la expresión génica de los receptores en los tejidos, contribuye a las diversas acciones de las tres ET. En un tejido particular, la distribución de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> puede variar.

La depuración de la ET-1 circulante se efectúa mediante la captación por los receptores ET<sub>B</sub>, primariamente por el pulmón, aunque también contribuyen el riñón y el hígado (Abassi y col., 1992; Fagny y col., 1992; Dupuis y col., 1996; Dupuis y col., 2000).

Karne y colaboradores han clonado y caracterizado un tercer tipo de receptor para endotelinas, el ET<sub>C</sub>, aislado a partir de melanóforos de la piel de *Xenopus laevis*. Este receptor une ET-3 con un orden de afinidad tres o cuatro veces mayor que ET-1 y puede estar presente también sobre células endoteliales (Karne y col., 1993).

### **I.1- d) Regulación de las endotelinas**

La hipoxia y la isquemia son importantes estímulos fisiológicos para la producción de ET-1 (Fukunaga y col., 1991). Este péptido también es estimulado por una variedad de sustancias que incluyen catecolaminas, trombina, angiotensina, lipoproteínas de alta y baja densidad, factor de crecimiento transformante-beta (TGFβ), citoquinas y cationes calcio (Ca<sup>2+</sup>). Varias sustancias vasoactivas como el óxido nítrico (ON), los péptidos natriuréticos, las prostaglandinas PG I<sub>2</sub> y PG E<sub>2</sub>, inhiben la producción y secreción de ET-1 (Balakrishnan y col., 1996; Morawietz y col., 2000a). La ET-1 a su vez, actúa estimulando la secreción de ON, péptidos natriuréticos, aldosterona y prostaglandinas (Fig. 2). A través de estas interacciones, las ET participan dinámicamente en el control hormonal, en el balance hidroelectrolítico y en el tono vascular (Balakrishnan y col., 1996; Pérez del Villar y col., 2005).

La síntesis de endotelina está regulada por un conjunto muy complejo de factores físico-químicos (Malek e Izumo, 1992; Balakrishnan y col., 1996; Morawietz y col., 2000b; Quehenberger y col., 2002; Savoia y Schiffrin, 2004; Pérez del Villar y col., 2005).

Se han identificado cuatro mecanismos diferentes de regulación de la concentración de las ETs (Inoue y col., 1989):

- Degradación lisosomal,
- Regulación a través de la enzima convertidora de endotelina,
- Degradación por endopeptidasas neutrales y
- Depuración de la endotelina circulante en el pulmón y riñón.

El 75% de la ET-1 actúa sobre las células musculares adyacentes al endotelio, donde se une a receptores específicos actuando fundamentalmente como un factor autocrino/paracrino más que como una hormona circulante. Sin embargo, en algunos estados patológicos como la

insuficiencia cardíaca congestiva y la hipertensión arterial pulmonar es posible detectarla en plasma o suero, donde los niveles se correlacionan con la severidad de las mismas.

En la Tabla II, se resumen los factores estimulantes e inhibidores más importantes de la síntesis de las ETs.

### **I.1- e) Efectos biológicos**

En adultos sanos, los niveles de endotelina en plasma son relativamente bajos (1-2 pg/mL). La ET-1 como se mencionó anteriormente no es una hormona circulante, sino que actúa como un factor autocrino/paracrino en múltiples sitios. La ET-1 y el receptor ET<sub>A</sub> probablemente, tengan un papel en el mantenimiento basal del tono vasomotor y de la presión sanguínea en humanos (Haynes y col., 1995). Además, la ET-1 posee actividad mitogénica en el músculo liso actuando vía la activación de ambos receptores (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>) y estimulando a su vez, la producción de citoquinas y factores de crecimiento (Luscher y Barton, 2000; Galie y col., 2004). También induce la formación de proteínas de la matriz extracelular, potencia el efecto del factor TGF- $\beta$  y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Luscher y Barton, 2000). El efecto en la producción de colágeno en fibroblastos de la piel es mediado por ambos receptores, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. En cambio en los fibroblastos cardíacos sólo intervendrían los receptores ET<sub>B</sub>. La ET-1 posee también una potente acción proinflamatoria (Jozsef y col., 2002; Seccia y col., 2003). Por otro lado, induce agregación plaquetaria y estimula la producción de aldosterona por un mecanismo mediado por los receptores ET<sub>B</sub> (Belloni y col., 1996; Galie y col., 2004).

Las concentraciones nanomolares de ET-1 tienen un efecto inotrópico y cronotrópico positivo y pueden inducir hipertrofia cardíaca por la estimulación de ambos receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (Ishikawa y col., 1988). Algunos mecanismos de acción importantes de la ET-1 se resumen en la tabla III.

Tabla II: Moduladores de la síntesis de Endotelina (Modificado de Gómez y col., 2004)

ESTIMULANTES	INHIBIDORES
Angiotensina II	Bradiquina
Vasopresina	Óxido Nítrico
Norepinefrina	Prostaglandina E <sub>2</sub> y I <sub>2</sub>
Isoprostano 8-epi-prostaglandina F <sub>2α</sub>	Adrenomedulina
Trombina	Péptidos Natriuréticos auricular y cerebral
Interleuquinas 1 y 3	Heparina
Factor de necrosis tumoral α	Hirudina
Factor estimulante de colonias de granulocitos	Altos niveles de estrés de estiramiento > 6 [dinas/cm <sup>2</sup> ]
Interferón-gamma	Nitratos
Factor de crecimiento transformante beta	Progesterona
Endotoxina	Estrógenos
Estrés mecánico	PPAR-alfa
Presión sin distorsión celular	Ionóforos de Calcio
Hipoxia	Montelukast
Bajos niveles de estrés de estiramiento < 2 [dinas/cm <sup>2</sup> ]	
Sobrecarga de presión	
Edad avanzada	
Insulina	
Serotonina	
Ciclosporina	
Corticoesteroides	
Eritropoyetina	
LDL-oxidadas	
Agregación plaquetaria	
Infiltración macrofágica	
Lesiones ateroscleróticas	

Tabla III: Efectos de la endotelina-1 en diferentes órganos (Modificado de Baltazares Lipp y col., 2005)

ÓRGANO-SISTEMA	EFEECTO
- VASOS SANGUÍNEOS	Potente sustancia vasoconstrictora Proliferación celular Remodelación celular y depósitos de colágeno Estimulación de la producción de óxido nítrico y prostaciclina vía receptores ET <sub>B</sub>
- CORAZÓN	Acción positiva inotrópica y cronotrópica bajo condiciones fisiológicas Incremento del potencial de acción Hipertrofia Disminución del gasto cardíaco <i>in vivo</i>
- PULMÓN	Broncoconstricción
- RIÑÓN	Incremento en la resistencia vascular Disminución en el grado de filtración glomerular y en el flujo sanguíneo renal Natriuresis y diuresis vía receptores ET <sub>B</sub> tubular
- ACCIÓN NEUROENDOCRINA	Estimulación de la secreción de péptidos natriuréticos, renina, aldosterona y catecolaminas

## **I.2 - ENDOTELINAS EN MURINOS**

### **I.2 - a) Sistema endotelina en ratón**

Como se desprende de los apartados anteriores, la mayor parte de lo que se conoce sobre las ETs está referido a dos de los ligandos del sistema: fundamentalmente la ET-1 seguida luego por la ET-3. Así, muchas de las funciones biológicas y roles fisiológicos de dichos péptidos se hallan bien documentados. Por el contrario se sabe muy poco acerca de los roles fisiológicos específicos de la ET-2.

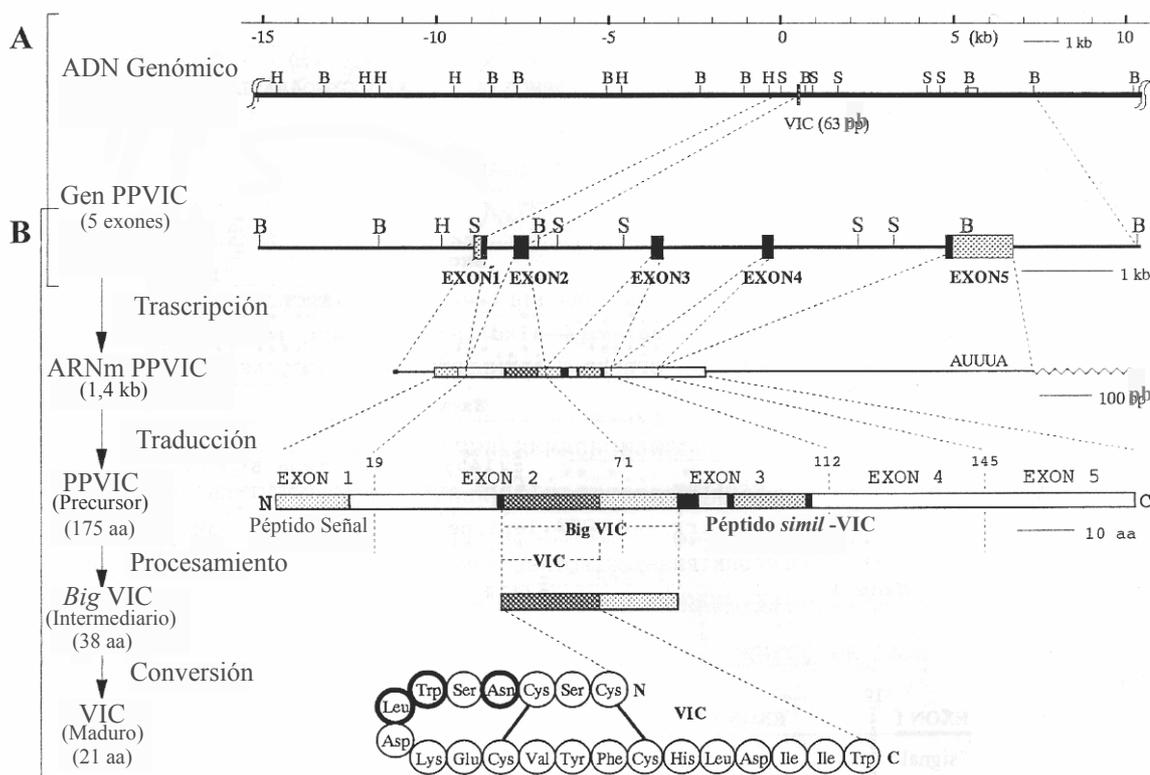
Para profundizar los conocimientos sobre ET-2, se optó por trabajar y analizar el sistema endotelina en ratón como modelo animal. Un nuevo miembro de la familia de las ETs, en esta especie fue identificado y clonado en el laboratorio donde se realizó parte del trabajo experimental de la presente tesis (Saida y col., 1989). Este homólogo de ET-2 fue descubierto utilizando clonado genómico en ratón y se lo denominó péptido Vasoactivo de Contracción Intestinal (VIC). Así, en esta especie las ETs son identificadas como: ET-1, VIC y ET-3; completándose el sistema con los receptores para endotelina A (ET<sub>A</sub>) y receptores para endotelina B (ET<sub>B</sub>). Puesto que el VIC difiere de la ET-2 humana sólo en un aminoácido, éste podría ser su contraparte en rata y ratón. De aquí en más, nos referiremos al péptido VIC/ET-2 de ratón, como una misma entidad.

Originalmente, se reportó que el VIC/ET-2 poseía actividad contráctil en el intestino de ratón en la porción correspondiente al íleon y en la arteria coronaria porcina (Ishida y col., 1989). El gen del péptido VIC/ET-2 se expresa en el intestino pero no en las células endoteliales, que producen ET-1 (Saida y col., 1989). VIC/ET-2 induce una serie de respuestas celulares, que incluyen la producción de segundos mensajeros, diacilglicerol, inositol 1,4,5-trisfosfato y un incremento del Ca<sup>2+</sup> libre en células de neuroblastoma. (Fu y col., 1989 y 1990).

### **I.2 - b) Análisis de la secuencia y estructura del gen VIC/ET-2**

Tanto el aislamiento de la longitud completa del gen prepro-VIC/ET-2, como la determinación de su secuencia y organización en el genoma se realizaron utilizando una sonda de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) proveniente de una librería genómica murina. Los datos de la secuencia están depositados en la librería EMBL/GenBank/DDBJ con número de entrada AB030303. Dicha secuencia posee una longitud total de 7411 pares de bases (pb). En la figura 4A se observa que de ésta, el gen prepro-VIC/ET-2 de ratón es codificado por 5 exones, interrumpidos por 4 intrones (comprendiendo, desde la primer base del primer exón hasta la

última base del quinto exón, un total de 5912 pb del ADN genómico). En el gen del prepro-VIC/ET-2 un 21% comprende su secuencia exónica y un 79% la intrónica. Todos los sitios de empalme donante/aceptor en la secuencia de nucleótidos que flanquean los extremos de los exones, están constituidos según la regla GT/AG (Shapiro y Senapathy, 1987). Este análisis, permite comprender la secuencia de eventos que conducen a la biosíntesis del péptido VIC/ET-2 bioactivo, la cuál se grafica en la figura 4B y se detalla a continuación.



**Figura 4:** Análisis de la secuencia y estructura del gen prepro-VIC/ET-2 de ratón. **A)** Organización genómica. La porción secuenciada del gen PPVIC/ET-2 y la porción de los 63 pb del VIC/ET-2 están conectadas por líneas de puntos a las correspondientes regiones del ADN genómico clonado. Las regiones codificantes están señaladas por recuadros negros; las regiones 5' y 3' no traducibles se señalan con recuadros punteados y las secuencias laterales 5' y 3' se indican mediante líneas. Los sitios de restricción son los siguientes: B, *Bam*HI; S, *Sac*I; H, *Hind*III. **B)** Representación esquemática del camino de biosíntesis desde el gen hasta el péptido VIC/ET-2 maduro. (Modificado de Saida y col., 2000).

El primer exón del prepro-VIC/ET-2, representa las secuencias correspondientes a la región 5' no traducible y la codificante de los 19 residuos amino terminales (M1-G19), de los cuales 15 corresponden al péptido señal (M1-A15). El segundo exón del prepro-VIC/ET-2 codifica los siguientes 53 residuos de aminoácidos (G19-G71) comprendiendo la región amino terminal del *Big*-VIC/ET-2 –incluyendo la secuencia del péptido activo VIC/ET-2 (C46-W66)–. El tercer exón del prepro-VIC/ET-2 codifica 42 residuos de aminoácidos (G71-W112), comprendiendo el resto C-terminal del *Big*-VIC/ET-2 y el péptido *simil*-VIC/ET-2 completo (C93-H108). Los

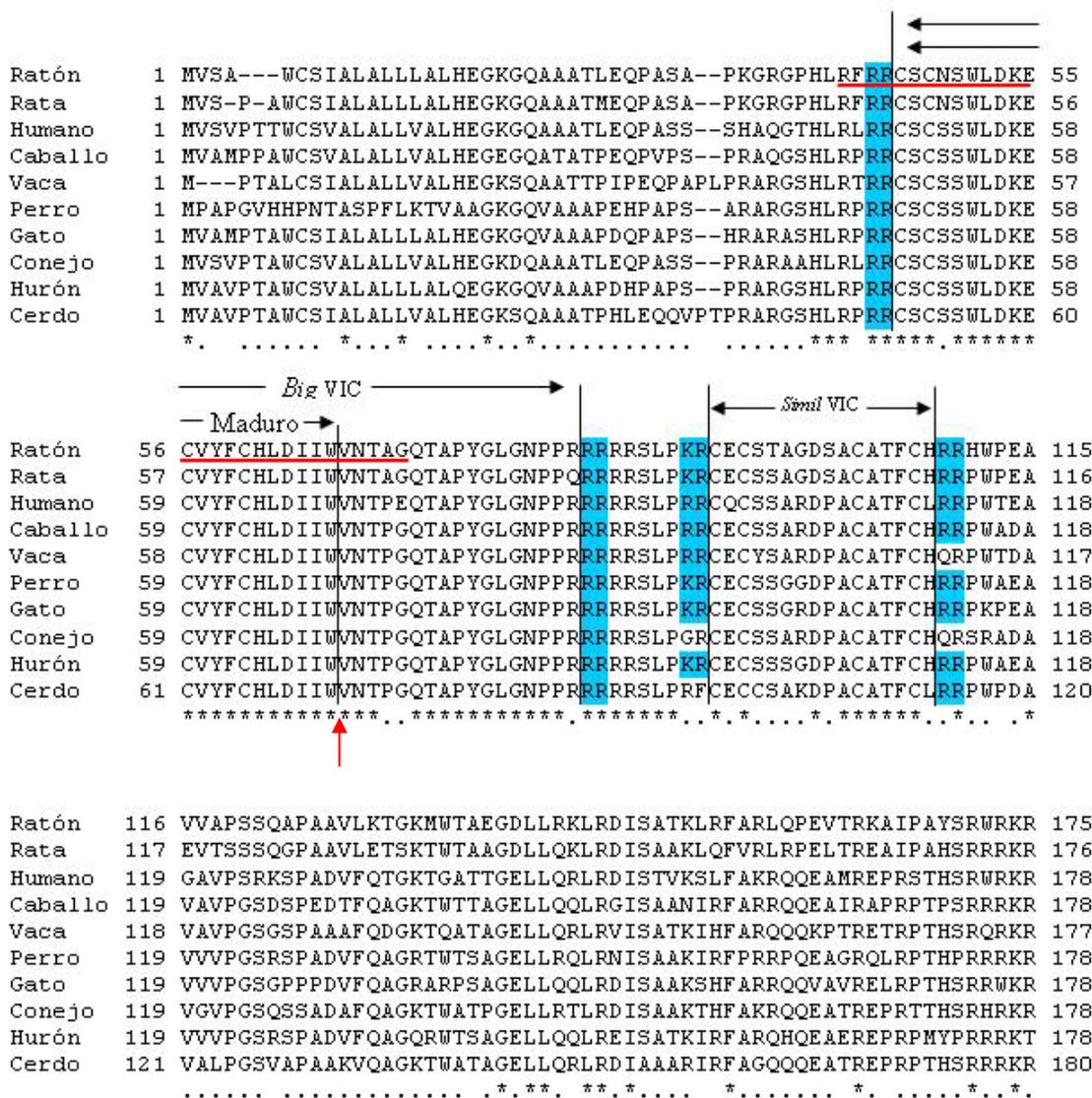
exones cuarto y quinto del prepro-VIC/ET-2 codifican 34 (W112-R145) y 31 (R145-R175) residuos de aminoácidos respectivamente. Estos, corresponden al extremo carboxilo del prepro péptido y al resto de la secuencia no traducible del extremo 3'.

Resumiendo, el péptido biológicamente activo VIC/ET-2, de 21 residuos de aa (63 pb), es procesado a partir de un precursor prepro-VIC/ET-2 de 175 aa, a partir de la conversión de un intermediario (*Big-VIC*) de 38 residuos de aa.

En la figura 5 se muestra un alineamiento comparativo de las secuencias de aminoácidos realizado entre el VIC/ET-2 de ratón y ET-2 de otros mamíferos utilizando el *software* Clustalx versión 1.8. Regiones altamente conservadas correspondientes al péptido maduro (C46-W66), a la forma conocida como *Big-VIC/ET-2* (C46-R83) y al *simil-VIC/ET-2* (C93-H108); están presentes en el PPVIC de ratón; como también en otros PPET-2 de mamíferos. Pares de residuos de aminoácidos básicos, que sirven de blanco para la acción de endopeptidasas, están presentes en las regiones N- y C-terminal del péptido *Big-VIC/ET-2* (R44-R45 y R84-R85) y en el péptido *simil-VIC/ET-2* (K91-R92 y R109-R110). También puede observarse el sitio blanco de la enzima convertidora de ET dentro del péptido *Big-VIC/ET-2* (W66-V67). El péptido *simil-VIC/ET-2* está relacionado estructuralmente con 16 residuos amino-terminales del VIC/ET-2 maduro. Poseen en común 9 aminoácidos, incluyendo 4 residuos cisteína en posiciones idénticas; éstas están flanqueadas por pares de aminoácidos básicos. Las regiones que codifican para los péptidos VIC/ET-2 y *simil-VIC/ET-2* son especificadas principalmente por los exones segundo y tercero respectivamente (Fig. 4).

Este análisis de la estructura primaria, basado en la secuencia del ADNc, muestra que las propiedades fundamentales observadas en la familia de las endotelinas (incluyendo organización de los dominios y los sitios blanco para el procesamiento de las peptidasas), se hallan bien conservadas en el PPVIC/ET-2 de ratón. Estas características coinciden con las de los otros mamíferos estudiados, lo que indicaría que el PPVIC/ET-2 de ratón es sintetizado a través de los mismos pasos de procesamiento que en otros mamíferos (Ohkubo y col., 1990; Saida y Mitsui, 1991; Deng, 1997; Uchide y col., 2003; Fujimori y col., 2003; Uchide y col., 2004).

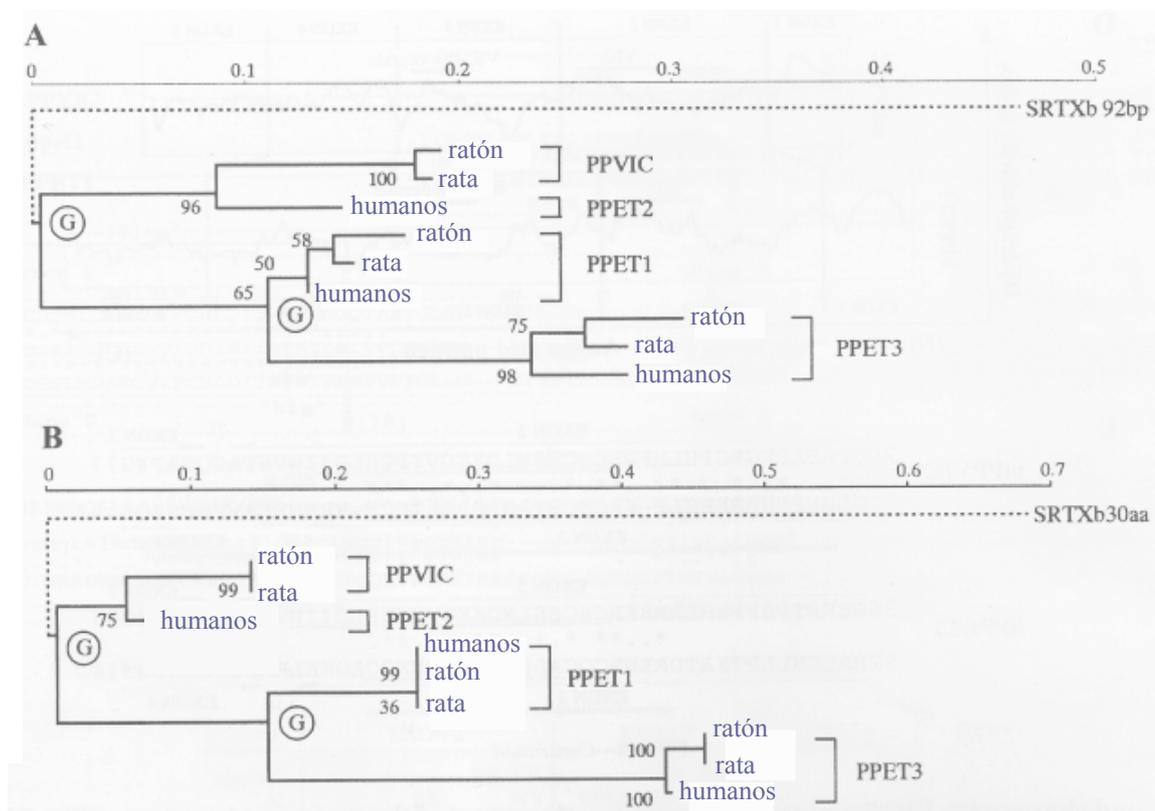
El porcentaje de secuencias de aminoácidos idénticas del VIC/ET-2 de ratón comparada con la de los otros mamíferos, es de 87,5% con rata sobre un total de 176 aa; 68,5% con humanos sobre un total de 178 aa; 67,4% con equinos sobre un total de 178 aa, 68,4% en bovinos sobre un total de 177 aa, 63,5% en caninos sobre un total de 178 aa, 68% en felinos sobre un total de 178 aa, 70,1% en conejos sobre un total de 178 aa, 70,2% en hurones sobre un total de 178 aa y 67,7% en porcinos sobre un total de 180 aa respectivamente.



**Figura 5:** Análisis comparativo de prepro VIC/ET-2 de ratón y ET-2 de rata, humano, caballo, vaca, perro, gato, conejo, hurón y cerdo. Las secuencias de aminoácidos, son alineadas para máxima analogía. Los residuos de aa son agrupados según los exones. Se indican los péptidos: maduro, *simil* y *big*. Las secuencias de aas idénticas y conservadas son indicadas por asteriscos y puntos negros respectivamente. Las líneas entrecortadas indican las posiciones en las que hay aminoácidos adicionales. En recuadros celestes se muestran pares de residuos de aminoácidos básicos reconocidos por endopeptidasas. La flecha roja indica el sitio blanco de la enzima convertidora de ET.

Para revelar la relación evolutiva entre los tres miembros, Saida y colaboradores realizaron un análisis filogenético de la familia de las ETs (ET-1, VIC/ET-2 y ET-3) (Saida y col., 2000). Las moléculas precursoras de los péptidos de la familia de ETs son divergentes, si se las compara con otras familias de proteínas. Sin embargo, en cada precursor, existe una región de 31 residuos de aminoácidos muy bien conservada que se corresponde con el péptido activo (indicada con una línea roja en la figura 5), la que deriva del fragmento “92-pb” del exón 2. El análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos de 9 genes de la familia ETs (tres genes de tres especies) fue

realizado sobre la región “92-pb”. El alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la región “92-pb” de los genes de prepro-VIC/ET-2 murino y prepro-ET-1 humano permitieron la comparación a través de las correspondientes secuencias de ADN complementario de otros genes de la familia de ETs de ratón, rata y humanos. En base a dichos datos, se elaboró un árbol filogenético por el método *neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987), utilizando el gen de la sarafotoxina (SRTX-b) del veneno de víbora como gen homólogo externo (Kloog y col., 1988; Ducancel y col., 1993) (Fig. 6A). Los genes de la familia de las tres ETs son fácilmente distinguibles unos de otros. La longitud de la rama del gen prepro-VIC/ET-2 es mucho más larga que la de la rama de la prepro-ET-1; indicando un estado evolutivo originado después de la divergencia de las especies, del primer gen respecto al segundo. El árbol filogenético preparado usando el método anteriormente mencionado con los 30 aminoácidos codificados a partir de la región de “92-pb” (Fig. 6B) también valida esta observación.



**Figura 6:** Análisis filogenético de los genes de la familia ETs. Alineamientos múltiples fueron realizados usando la secuencia de nucleótidos de “92-pb” (A) o de la secuencia deducida de 30 aa en (B). Los valores al final de las ramas representan límites de confianza. (G) indica el evento de duplicación del gen. (Modificado de Saida y col., 2000).

## **I.2 - c) Estudios sobre las funciones del gen VIC/ET-2**

Estructuralmente, el VIC/ET-2 es muy similar a la ET-1. El VIC/ET-2 difiere de la ET-1 sólo en 3, de los 21 residuos de aa, mientras que la ET-2 difiere de la ET-1 en 2 residuos de aa. Dado el alto grado de homología de estos tres péptidos, no existen diferencias en la antigenicidad entre VIC/ET-2 y ET-1, por otra parte no hay ninguna diferencia en su selectividad por los receptores ET<sub>A</sub> o ET<sub>B</sub>. Estas similitudes dificultan el análisis de las actividades fisiológicas específicas de cada ligando. Si bien, como se mencionó anteriormente, los roles fisiológicos de la ET-1 y la ET-3 se encuentran bien documentados; muy poco se sabe de los roles fisiológicos específicos del VIC/ET-2.

Si bien la distribución tisular del ARNm para VIC/ET-2 en tracto intestinal de rata ha sido reportada utilizando el ensayo de protección frente a la ARNasa (de la Monte y col., 1995); al momento del comienzo de esta tesis, existían pocos estudios abordando integralmente la distribución celular del ARNm para VIC/ET-2 en tejidos de animales adultos y a través de los diferentes estadios del desarrollo embrionario. Asimismo, no se conocían estudios cuantitativos y comparativos que abordasen la expresión génica de todos los miembros del sistema endotelina. Estos estudios son necesarios para comenzar a comprender e identificar los tejidos específicos y los estadios del desarrollo donde preferentemente se expresa el gen VIC/ET-2.

Se han reportado varios estudios sobre la distribución de cada miembro del sistema de las ETs en diversos tejidos (Yanagisawa y col., 1988; Bloch y col., 1989; MacCumber y col., 1989; Matsumoto y col., 1989; Saida y col., 1989, Arai y col., 1990; Nunez y col., 1990; Sakurai y col., 1990; Sakurai y col., 1991; Firth y Ractliffe, 1992; Shiba y col., 1992); sin embargo, estos reportes se han presentado en diferentes especies (roedores, humanos y porcinos), utilizando diferentes métodos (*Northern blot*, ensayo de protección frente a la ARNasa, inmunodetección y RT-PCR), aplicados en diferentes estadios ontogenéticos y sin que se consideren integralmente los ligandos y los receptores del sistema de las endotelinas. Los resultados de estos estudios, demostraron que la expresión del ARN mensajero para las ET-1 y ET-3 así como la de los receptores, se encuentra co-localizada en varios tejidos, sugiriendo que la ET-1 y la ET-3 poseen una acción autocrina y/o paracrina (MacCumber y col., 1989; Huggins y col., 1993), por lo que el sistema se torna muy complejo de relevar.

Con la finalidad de unificar los estudios sobre el VIC/ET-2, utilizando el método semi-cuantitativo de transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (*RT-PCR*, del Inglés: *Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction*), se caracterizó la especificidad tisular de la expresión génica del VIC/ET-2 en relación con los demás miembros

del sistema de las endotelinas, en diferentes tejidos murinos adultos y en diferentes estadios del desarrollo (Uchide y col., 1999). De este trabajo se desprende que, comparada con la expresión de la ET-1, la ET-3, o los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, la expresión del VIC/ET-2 está restringida a un conjunto limitado de tejidos. Confirmando los resultados obtenidos en estudios previos (Saida y col., 1989; Saida y Mitsui, 1991), la expresión fue especialmente abundante en el intestino; como así también en ovario y en útero. De estos estudios se desprende que el VIC/ET-2 además de su rol en la contracción intestinal, podría ejercer importante/s rol/es fisiológico/s en ovario y útero y durante algunos estadios del desarrollo embrionario.

A partir de estos datos y con el fin de profundizar los conocimientos sobre los roles fisiológicos del VIC/ET-2 en estos y otros órganos y durante el desarrollo embrionario; se trabajó sobre la puesta a punto de una nueva técnica para cuantificar sistemáticamente, en forma automática y precisa, la expresión génica del VIC/ET-2 en varios órganos de ratón.

## **I.2 - d) Análisis de la expresión génica de VIC/ET-2 usando PCR en tiempo real.**

Puesto que VIC/ET-2 se une a los receptores aproximadamente con la misma selectividad que la ET-1 (Arai y col., 1990); se postula que los péptidos VIC/ET-2 y ET-1 poseen funciones biológicas similares. Éstas hacen que sea muy complicado comprender la importancia biológica específica del gen VIC/ET-2 *in vivo* o al menos, discriminarlas en relación con las especificadas para la ET-1. Parte del problema se ha resuelto, utilizando diferentes métodos de biología molecular, los que han resultado eficientes para dilucidar las diferencias entre la distribución tisular y los niveles de expresión del ARNm para VIC/ET-2 y ET-1. Por ejemplo, los niveles de expresión génica de VIC/ET-2 y ET-1 han sido examinados por experimentos de *Northern blot* y ensayo de protección frente a la ARNasa (Saida y Mitsui, 1991; Sakurai y col., 1991; Firth y Ratcliffe, 1992; de la Monte y col., 1995). Sin embargo, estas técnicas no son lo suficientemente sensibles como para detectar niveles muy bajos de ARNm para VIC/ET-2 o ET-1.

Los estudios de Uchide y colaboradores se valieron de un método semicuantitativo de transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (*RT-PCR*), más sensible que los mencionados anteriormente (Uchide y col., 1999). No obstante, el método tiene sus inconvenientes, puesto que requiere de múltiples pasos, no siempre reproducibles, que culminan en una cuantificación por densitometría. Todos estos pasos, hacen que el método sea lento, de difícil optimización y obviamente, que siempre se corra el riesgo de contaminación.

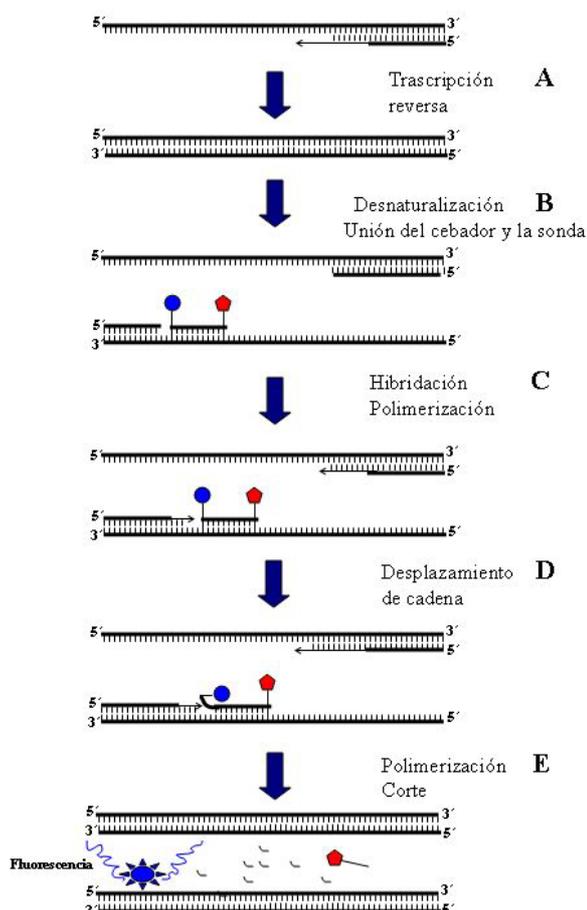
Para intentar incrementar la sensibilidad de dichos estudios se utilizó un nuevo método basado

en la técnica de PCR en tiempo real (Gibson y col., 1996; Heid y col., 1996). En este método, los procesos de amplificación y detección se producen simultáneamente en el mismo tubo cerrado, utilizando señales fluorescentes. La detección por esta técnica permite medir constantemente la cantidad de ADN sintetizado, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción, es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Higuchi y col., 1993). Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para medir continuamente la fluorescencia emitida en cada uno de los tubos donde se realiza la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en los métodos de PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: por agentes intercalantes o por sondas específicas, marcadas con fluorocromos diseñados especialmente.

Los trabajos aquí presentados, fueron realizados utilizando sondas de hibridación específicas. Éstas, poseen dos tipos de fluorocromos marcadores, el donante y el aceptor. El proceso se basa en la transferencia de la energía fluorescente por resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más conocidas, que fueron utilizadas en esta tesis, son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas *TaqMan*. Estas son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donante en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donante. Para que esto ocurra, las moléculas donante y aceptora deben estar próximas espacialmente y el espectro de emisión de la primera debe solaparse con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda permanece intacta, la fluorescencia emitida por el donante es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleásica, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donante (Holland y col., 1991). Como donante y aceptor quedan espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el sistema de registro (Fig. 7).

En este trabajo, utilizando la metodología de PCR en tiempo real, se presenta por primera vez un análisis integral sobre los niveles de expresión génica del sistema de las endotelinas –ligandos (VIC/ET-2 y ET-1) y receptores (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>)–. Este es un método de cuantificación rápido, que fue puesto a punto específicamente para este trabajo de tesis. El análisis se realizó en forma comparativa y cuantitativa, en varios órganos de animales adultos de una misma especie y durante algunos estadios del desarrollo embrionario. Considerando la escasa cantidad de ARNm –principalmente de los ligandos VIC/ET-2 y ET-1– en los tejidos embrionarios y adultos objeto

de estudio; la técnica mostró alta sensibilidad y especificidad, atributos necesarios para lograr los objetivos generales propuestos.



**Figura 7:** Procedimiento *TaqMan*. (A) Este paso sintetiza una copia de ADNc partiendo del ARNm. (B) Luego de la desnaturalización, los cebadores y la sonda se unen. La proximidad de los dos marcadores hace que la señal fluorescente se agote. (C) Procedimiento de polimerización a la misma temperatura que la unión. (D) La polimerasa desplaza e hidroliza la sonda marcada. (E) El marcador fluorescente se aleja del fluoróforo que lo mantenía apagado y entonces la señal fluorescente comienza a ser detectada. Esta señal es proporcional al número de moléculas presentes al final del ciclo. (Modificado de Bustin, 2000).

### I.3 – ESTUDIOS ESPECÍFICOS SOBRE VIC/ET-2 y ET-1

#### I.3- a) Identificación de sistemas con distribución y expresión diferencial del gen VIC/ET-2

La expresión del gen aquí analizado, originalmente fue hallada sólo en intestino, utilizando la técnica de *northern blot* (Saida y col., 1989). Posteriormente, recurriendo a técnicas más sensibles como la RT-PCR y actualmente con el análisis de PCR en tiempo real; se reveló que el gen

VIC/ET-2 no sólo es expresado en intestino sino también en estómago, ovario, útero, testículo y cerebro (Saida y col., 2000; Uchide y col., 1999; Uchide y col., 2000a y 2000b; Uchide y col., 2001a y 2001b). Trabajos realizados por otros autores, han demostrado que VIC/ET-2 es expresado con relativamente altos niveles en la glándula pituitaria de rata y ratón aunque dicha expresión es menor que la de ET-1 (Masuo y col., 2003). Por otro lado, además de estos estudios de expresión génica, los ligandos de ETs se han analizado por inmunohistoquímica y por HPLC de fase reversa (Matsumoto y col., 1989; Wang y col., 1999). Actualmente existe un equipo comercial que emplea la técnica de ELISA para medir la producción de ET-1. No obstante, el anticuerpo de dicho equipo es incapaz de discernir entre la ET-1 y la ET-2 (McCartney y col., 2002) e incluso presenta reactividad cruzada con la ET-3. Esto significa, que un análisis usando sólo este método no es útil para determinar cuantitativamente los niveles de ET-1 y ET-2.

Sin embargo, tanto en esta tesis como en otro trabajo contemporáneo, se utilizó un anticuerpo altamente específico para VIC/ET-2, que no exhibe reactividad cruzada con la ET-1 (Kotake-Nara y col., 2005; Takizawa y col., 2005); lo que permitió demostrar por primera vez, por técnicas de inmunohistoquímica, la localización tisular del péptido VIC/ET-2 (Adur y col., 2003; Takizawa y col., 2005).

Del estudio comparativo global que se presenta y de acuerdo a los nuevos hallazgos de los estudios de expresión del ARNm y de la distribución del péptido VIC/ET-2 resumidos en el párrafo anterior, se propuso analizar con más detalle el comportamiento del gen VIC/ET-2 en órganos específicos del sistema digestivo y piel.

### **I.3-b) Nuevos roles fisiológicos del gen VIC/ET-2 identificados en intestino y en piel de ratón.**

Como se definió anteriormente, dada la similar selectividad y afinidad de VIC/ET-2 y ET-1 por los receptores, muchas de las actividades biológicas de VIC/ET-2 se solapan con las de la ET-1. Sin embargo, mientras se realizaba esta tesis, se reportaron nuevos roles funcionales específicos para el gen VIC/ET-2, diferentes a los de la ET-1. En primer lugar se reportó que la hipoxia estimula la síntesis del ARNm para VIC/ET-2 en líneas celulares de tumores mamarios en la que el VIC/ET-2 actuaría como un factor de supervivencia autocrino induciendo hipoxia en estas células (Grimshaw y col., 2002a). También se reportó que VIC/ET-2 es un agente quimioattractante de macrófagos, que modularía su distribución en tumores (Grimshaw y col., 2002b). Un tercer rol reportado postula que, VIC/ET-2 podría estar involucrado en la invasión de tejidos tumorales (Grimshaw y col., 2004). Finalmente, VIC/ET-2 es uno de los cuatro

candidatos a constituirse como marcador tumoral en líneas celulares de melanomas por UV y podría estar involucrado en el desarrollo de melanoma inducido por la radiación UV (Zuidervaart y col., 2003). En esta tesis a partir de evidencias morfológicas y bioquímicas, se postulan nuevos roles específicos para VIC/ET-2 en intestino y en piel.

### **I.3-b.1) VIC/ET-2 en la mucosa intestinal**

Los estudios de Egidy, Massai y colaboradores permitieron detectar ARNm para ET-1 en el epitelio, en células del estroma y en macrófagos de la lámina propia en el intestino delgado humano (Egidy y col., 2000a y 2000b; Massai y col., 2003). Los péptidos ET-1 y ET-3 se localizan en la mucosa del intestino de rata (Takahashi y col., 1990). La inmunoreactividad para ET-1 fue observada además en neuronas del colon humano, sugiriéndose que ET-1 podría modular la motilidad y secreción, actuando como un neuropéptido (Inagaki y col., 1991; Escrig y col., 1992). Estudios con ratones deficientes en ET-3 han demostrado que ésta es esencial para el desarrollo de las neuronas intestinales (Baynash y col., 1994). Se ha reportado también que el ARNm para VIC/ET-2 se expresa predominantemente en las células del estroma de la lámina propia (de la Monte y col., 1995). Sin embargo, al momento de realizar esta tesis, no existía información detallada sobre la expresión y distribución del péptido VIC/ET-2 en el tracto intestinal de ratón. Por otra parte, se ha especulado que las endotelinas están implicadas en varias patologías del tubo digestivo, como la denominada enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Adicionalmente, se ha reportado que las ETs producen úlceras en ratas (Wallace y col., 1989) y la expresión de la ET-1 y aumento de la ET-1 circulante en pacientes con la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (Murch y col., 1992; Rachmilewitz y col., 1992). Estudios realizados en humanos con la patología inflamatoria intestinal, demostraron que la expresión de ET-2 fue predominante respecto a ET-1 en el colon, aunque no se evidenciaron cambios significativos en los niveles de ARNm para ET-2 (McCartney y col., 2002). Utilizando ratas como modelo experimental, McCartney y colaboradores indujeron colitis ulcerosa utilizando ácido trinitrobencensulfónico. En este estudio, la expresión génica de la ET-1 predominó sobre la de la ET-2 (McCartney y col., 2002). Hogaboam y colaboradores realizaron experiencias con antagonistas de ETs, mostrando que el sistema ET estaría involucrado cuando se produce colitis por injurias (Hogaboam y col., 1996).

En este trabajo se propuso determinar primero la localización específica del VIC/ET-2 en el tracto intestinal de ratón. Para evaluar su comportamiento se indujo experimentalmente un cuadro de colitis ulcerosa, administrando por vía oral, sulfato de sodio dextran (DSS). Posteriormente se analizó por inmunohistoquímica la expresión del péptido VIC/ET-2 en el

intestino de animales normales y en el de los que fueron inducidos a desarrollar la patología.

### **I.3-b.2) VIC/ET-2 en piel y su comportamiento frente a la exposición UV**

Es sabido que en respuesta a la exposición a la radiación ultravioleta, en humanos y algunos animales, se produce un incremento en el contenido de melanina de la piel. Diferentes estudios, a nivel celular y tisular, demostraron que los melanocitos se activan en la capa basal de la epidermis luego de ser expuestos a la luz ultravioleta (Stierner, 1991). Adicionalmente, los melanocitos son estimulados para producir más melanina, por lo que la tasa de transformación a melanosomas se incrementa (Funasaka y col., 1998).

Se ha demostrado que la ET-1 y sus sitios de unión están localizados en la zona irrigada de la dermis (Bull y col., 1991; Knock y col., 1993). Yohn y colaboradores, comprobaron que los queratinocitos en cultivo sintetizan y secretan ET-1 (Yohn y col., 1993). En otros estudios se ha indicado además que ET-1 estimula la melanogénesis, la proliferación de los melanocitos y la formación dendrítica (Imokawa y col., 1995; Hara y col., 1995; Tsuboi y col., 1995). Otras evidencias, sugieren que ET-1 actúa como factor mitogénico para los queratinocitos y como un estimulador de la contracción de los fibroblastos de la dermis.

Asimismo, se ha reportado que la expresión de ET-1 y sus sitios de unión en la piel de ratones se incrementa luego de su exposición a la radiación UV-B (Ahn y col., 1998). Por otro lado, Tsuboi y colaboradores demostraron que la IL-1 $\alpha$  y la radiación UV-B aplicados sobre queratinocitos en cultivo estimulan tanto la expresión de ARNm para ET-1 y la secreción de este péptido como la expresión de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (Tsuboi y col., 1995). Recientemente, otros experimentos demostraron una importante relación entre el comportamiento de la expresión de la ET-1 secretada por queratinocitos y la radiación UV-A y UV-B (Hachiya y col., 2004; Brenner y col., 2005; Kadekaro y col., 2005).

En este trabajo se estudió la expresión de ARNm para VIC/ET-2 y la distribución del péptido en la piel de ratones neonatos sometidos a radiación UV. Para determinar los probables efectos mediante un examen comparativo, el sistema de las ETs –ligandos (VIC/ET-2 y ET-1) y receptores (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>)– fue analizado bajo los tres tipos de radiación ultravioleta: a longitudes de onda larga (UV-A), longitud de onda media (UV-B) y longitud de onda corta (UV-C).

## II – OBJETIVOS

### II.1 – GENERALES

Los objetivos generales planteados al momento de iniciarse esta tesis consistían en el establecimiento de los posibles roles fisiológicos del péptido Vasoactivo de Contracción Intestinal (VIC/ET-2) y de la Endotelina-1 (ET-1) en la ontogenia de vertebrados, utilizando ratones como modelos experimentales.

### II.2 – PARTICULARES

II.2-a. Estudiar mediante el uso combinado de técnicas de PCR en tiempo real, inmunohistoquímica e hibridación *in situ* la cuantificación y localización espacio – temporal de los ligandos VIC/ET-2, ET-1 y sus receptores en modelos murinos.

II. 2-b. Determinar el rol del VIC/ET-2 en el tracto intestinal de animales normales y en aquellos que presenten alguna de las patologías asociadas a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal; por medio del estudio de la distribución específica de VIC/ET-2 a lo largo de todo el tracto intestinal del ratón y en el colon por inducción de colitis ulcerosa

II.2-b. Determinar la influencia de la radiación UV sobre la expresión y distribución de las ETs en la piel de neonatos; trabajando con diferentes longitudes de onda de radiación UV y realizando un análisis comparativo entre las diferentes endotelinas.