

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**PAPEL DE LA ENDOTELINA-1 EN LA ACTIVACION DE LOS
NEUTROFILOS HUMANOS. RELACION CON EL SISTEMA OXIDO
NITRICO/GUANOSIN MONOFOSFATO CICLICO.**

TESIS DOCTORAL

AMPARO RIESCO GARCIA DE LA TORRE

Madrid, 1996

Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)
28040 - MADRID

D. SANTOS CASADO PEREZ, JEFE DEL SERVICIO DE NEFROLOGIA DE LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ, PROFESOR ASOCIADO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID.

CERTIFICA:

Que Dña. Amparo Riesco Garca de la Torre, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección y supervisión la tesis titulada: "Papel de la Endotelina-1 en la activación de los neutrófilos humanos. Relación con el sistema óxido nítrico/Guanosín monofosfato cíclico" en el Laboratorio de Nefrología e Hipertensión de la Fundación Jiménez Díaz.

El presente trabajo reúne las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral y para que conste, firmo la presente en Madrid a 11 de Octubre de mil novecientos noventa y seis.

Fdo: Dr Santos Casado Pérez
Jefe del Servicio de Nefrología FJD.

Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

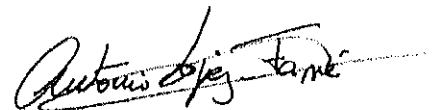
Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)
28040 - MADRID

D. ANTONIO LOPEZ FARRE, DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, ADJUNTO DE INVESTIGACION DE LA FUNDACION JIMENEZ DIAZ Y PROFESOR HONORARIO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID.

CERTIFICA:

Que Dña. Amparo Riesco García de la Torre, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección y supervisión la tesis titulada: "Papel de la Endotelina-1 en la activación de los neutrófilos humanos. Relación con el sistema óxido nítrico/Guanosín monofosfato cíclico" en el Laboratorio de Nefrología e Hipertensión de la Fundación Jiménez Díaz.

El presente trabajo reúne las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral y para que conste, firmo la presente en Madrid a 11 de Octubre de mil novecientos noventa y seis.



Fdo. Dr. Antonio López Farré.
Adjunto de Investigación FJD.

Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)
28040 - MADRID

D. CARLOS CAMELO DIAZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID.

CERTIFICA:

Que Dña. Amparo Riesco García de la Torre, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección y supervisión la tesis titulada: "Papel de la Endotelina-1 en la activación de los neutrófilos humanos. Relación con el sistema óxido nítrico/Guanosín monofosfato cíclico" en el Laboratorio de Nefrología e Hipertensión de la Fundación Jiménez Díaz.

El presente trabajo reúne las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral y para que conste, firmo la presente en Madrid a 11 de Octubre de mil novecientos noventa y seis.



Fdo. Dr. Carlos Camelo Díaz
Prof. Asociado UAM.

RELACION DE TRABAJOS CIENTIFICOS PUBLICADOS Y COMUNICACIONES RELACIONADAS CON EL TEMA DE LA TESIS DOCTORAL.

PUBLICACIONES INTERNACIONALES

- López-Farré A., A. Riesco, M. Moliz, J. Egido, S. Casado, L. Hernando, C. Caramelo. "Inhibition by L-arginine of endothelin mediated increase in cytosolic calcium in human neutrophils". *Biochemical Biophysical Research Communication*. 1991 178 (3): 884-891.
- Gómez-Garré D., M. Guerra, E. González, A. Riesco, A. Lopez Farré, y C. Caramelo, J. Escanero, J. Egido. "Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes by endothelin: Role of platelet-activating factor". *Eur. J. Pharmacol.* 1992.224:167-172.
- Riesco A., C. Caramelo, G. Blum, M. Montón, MJ Gallego, S. Casado, A. López-Farré. "Nitric oxide generating system as an autocrine mechanism on human polymorphonuclear leukocytes (PMN)". *Biochemical Journal*. 1993.292:791-796.
- A. López Farré.,; A. Riesco, G. Espinosa, E. Digiuni, MR Cernadas, V. Alvarez, M. Montón, F. Rivas, M.J. Gallego, J. Egido, S. Casado, C. Caramelo. "Effect of Endothelin-1 on Neutrophil Adhesion to Endothelial Cells and Perfused Heart". *Circulation*. 1993. 88:1166-1171.
- A. López Farré. A. Riesco, E. Digiuni, JR. Mosquera, C. Caramelo, L. Sánchez de Miguel, I. Millás, T. de Frutos, MR. Cernadas, M. Montón, J. Alonso, S. Casado. "Aspirin-stimulated nitric oxide production by neutrophils after acute myocardial ischemia in rabbits". *Circulation* 1996;94:83-87.

CONGRESOS INTERNACIONALES

- **Mesangial cells and extracellular matrix: A forefronts in Nephrology. Symposium of the International Society of Nephrology. Kloster Banz 9-12 Junio 1991.** "Endothelin increases cytosolic calcium in human and rat polymorphonuclear leukocytes. Inhibition by L-arginine". A. López-Farré, A. Riesco, M. Moliz, S. Casado, L. Hernando, C. Caramelo.-
- **Council for High Blood Pressure Research. 45th Annual Fall conference and Scientific**

Sessions. Chicago 24-27 Septiembre 1991. "Endothelin increases cytosolic calcium in human and rat polymorphonuclear leukocytes. Inhibition by L-Arginine". A. López Farré, A. Riesco, M. Moliz, S. Casado, V. Lahera, L. Hernando, C. Caramelo.

- VII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología. Sevilla, 29-31 Octubre 1991. "Efecto de la Endotelina (ET) en la agregación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Papel del factor activador de plaquetas (PAF). Dulcenombre Gómez-Garré, M. Guerra, E. González, A. Riesco, A. López-Farré, C. Caramelo, J. Egado.

- 24th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Baltimore 17-20 Noviembre 1991. "Role of endothelin (ET) in the stimulation of human and rat polymorphonuclear leukocytes (PMN). Inhibition by L-Arginine (L-Arg). A. López Farré, A. Riesco, M.R. Cernadas, G. Espinosa, J. Egado, L. Hernando, S. Casado, C. Caramelo.

- Premio de la "EUROPEAN DIALYSIS AND TRANSPLANTATION ASSOCIATION" (1992) por el trabajo titulado "Endothelin (ET) stimulates human polymorphonuclear leukocytes adhesion to endothelial cells: regulation by cGMP". A. López Farré, A. Riesco, V. Alvarez, J. Egado, G. Echefarreta, MJ. Gallego, M. Montón, G. Blum, D. Gómez Garré, L. Hernando, F. Sánchez Madrid, S. Casado, C. Caramelo. Presentado en París, (Francia) el 28 de Junio de 1992.

- XXIXth Congress of European Dialysis and Transplant Association. Paris (Francia) 28 Junio- 1 Julio, 1992. "Endothelin (ET) stimulates human polymorphonuclear (PMN) adhesion to endothelial cells: regulation by cGMP". A. López-Farré, A. Riesco, V. Alvarez, J. Egado, G. Echefarreta, MJ. Gallego, M. Montón, G. Blum, D. Gómez-Garré, L. Hernando, S. Casado, C. Caramelo.

- XIVth Congress of the European society of Cardiology. Barcelona (España) 30 Agosto- 3 Septiembre, 1992. Endothelin stimulates human polymorphonuclear leukocytes adhesion to endothelial cells and accumulation into perfused organs: regulation by nitric oxide. A. López-Farré, A. Riesco, G. Espinosa, V. Alvarez, J. Egado, G. Echezarreta, F. Rivas, M.J. Gallego, M. Montón, L. Hernando, F. Sánchez-Madrid, S. Casado, C. Caramelo.

- I Congreso Hispanoamericano de Nefrología. Barcelona (España). Octubre 1992. Papel de la Endotelina en la adhesion de leucocitos polimorfonucleares a las celulas endoteliales (CE), y su

acumulación en organos perfundidos. A. López-Farré, A. Riesco, MR Cernadas, G. Espinosa, V. Álvarez, M. Montón, G. Blum, J. Egido, F. Sánchez-Madrid, S. Casado, C. Caramelo.

- **25th Annual Meeting of the American Society of Nephrology.** Baltimore 15-18 Noviembre 1992. "Role of Integrins on endothelin (ET-1)-induced polymorphonuclear leukocytes (PMN) adhesion to the endothelium. A. López-Farré, A. Riesco, G. Espinosa, E. Digiuni, V. Alvarez, M. Montón, M. J. Gallego, S. Casado, F. Sanchez-Madrid, C. Caramelo.

- **25th Annual Meeting of the American Society of Nephrology.** Baltimore 15-18 Noviembre 1992. "Effects of Endothelin on human polymorphonuclear leukocytes aggregation. Role of PAF". D. Gomez Garré, M. Guerra, A. Riesco, A. López Farré, J. Egido.

A mi familia

A Juan Antonio

AGRADACEMIENTOS

- Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Santos Casado, Jefe del Servicio de Nefrología, y director de esta tesis por el afecto que siempre he recibido por su parte y por su impulso constante al trabajo científico desarrollado en el laboratorio.

- Al Dr. Antonio López Farré, director de esta tesis, por todos los conocimientos que he adquirido a lo largo de estos años, su inagotable ayuda y sus buenos consejos de amigo.

- Al Dr. Carlos Caramelo, director de esta tesis, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, su confianza y su apoyo.

- Al Dr. Jose M^a Culebras, tutor de esta tesis por el interés mostrado en la coordinación del trabajo.

- Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISSS), y al Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) por la concesión de las becas que han hecho posible la realización de esta tesis.

- A la Fundación Jiménez Díaz por poner a mi disposición todas las instalaciones necesarias y ser en muchas ocasiones mi segunda casa.

- A Inma por el apoyo que me ha dado y lo que me ha enseñado con su ejemplo de esfuerzo y dedicación.

- A todos mis compañeros de laboratorio con los que compartí durante estos años aventuras y desventuras, por su colaboración, su paciencia y los buenos ratos pasados. De forma muy especial agradezco:

a M^a José sus enseñanzas y su amistad en los primeros momentos.

a Mercedes su ayuda incondicional y su amistad que ha sido un apoyo inestimable.

a Lourdes su empeño en ayudarme.

a Javi su paciencia como maestro de informática.

- Al Dr. Enzo Digiuni y a Gau por su trabajo en la parte in vivo de los experimentos.

- Al Dr. Jesús Egido y todo su grupo por saber que cuento siempre con su ayuda y sus constantes ánimos.

- A Marisa, Mariví y Mercedes por ser tan buenas compañeras.

- A todos los donantes "voluntarios" que con buen humor colaboraron con un poquito de su sangre.

- Al Servicio de la Unidad de Diálisis de la FJD, en especial a Choni y Ana por su paciencia y su buen hacer como enfermeras.

- A Maruja, Josefa, Holly, Chiqui por hacer que todo fuera más fácil y divertido.

- A mis amigos.

ABREVIATURAS EMPLEADAS (*)

AMPc: adenosín monofosfato cíclico
ATP: adenosín trifosfato
BQ-123: D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-D-Trp
[Ca²⁺]_i: calcio libre citosólico
DAG: 1,2-diacilglicerol
EDRF: factor relajante dependiente de endotelio
EGTA: Acido etilen glicol bis(β-aminoetil eter) N,N,N',N'-tetraacético
ET: endotelina
FMLP: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
GMPc: guanosín monofosfato cíclico
GTP: guanosín trifosfato
ICAM-1: moléculas de adhesión intercelular tipo 1
ICAM-2: moléculas de adhesión intercelular tipo 2
IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina
IP₃: Inositol-1,4,5-trifosfato
IRL-1038: [Cys11-Cys15]endotelina-1-(11-21)
LFA-1: factor de adhesión leucocitaria-1 o CD11a/CD18
L-NAME: N^wL-nitro-L-arginina metil ester
L-NMMA: N^s-monometil-L-arginina
LPS: Lipopolisacarido bacteriano
LTB₄/LTC₄: Leucotrieno B₄/Leucotrieno C₄
MAC-1: molécula de adhesión intercelular- o CD11b/CD18
NO: óxido nítrico
NOS: NO sintasa
N^wNLA: N^w-nitro-L-arginina
O₂⁻: anión superóxido
OH: radical hidroxilo
PAF: factor activador de plaquetas
PGI₂: prostaciclina
PMA: Forbol 12 miristato-13-acetato
PKC: Proteína quinasa C
SOD: superóxido dismutasa

(*) Esta lista de abreviaturas incluye las más empleadas en el texto. En algunas figuras se han utilizado abreviaturas adicionales, cuyo significado se aclara en cada caso.

Indice

INDICE

I. INTRODUCCION	6
1.- El endotelio vascular	7
1.1.- Aspectos Generales. Agentes vasoactivos liberados por el endotelio	8
1.2.- Agentes Vasoconstrictores. Endotelina	9
1.2.1.- Síntesis y Estructura Química	10
1.2.2.- Receptores	11
1.2.3.- Señales celulares activadas por endotelina	12
1.2.4.- Efectos fisiológicos	14
1.3.- Agentes vasodilatadores. Oxido Nítrico	17
1.3.1.- Síntesis de NO	17
1.3.2.- NO Sintasa	19
1.3.3.- Guanilato Ciclasa. GMPc	21
1.3.4.- Efectos fisiológicos del NO	21
2.- El neutrófilo	22
2.1.- Morfología	23
2.2.- Mecanismos de Transducción de señal	23
2.2.1.- Polimerización de actina	25
2.3.- Características funcionales	26
2.3.1.- Quimiotaxis y Movilidad	26
2.3.2.- Adhesión. Aspectos Generales	27
2.3.2.1.- Moléculas de Adhesión	28
2.4.- Fisiopatología	31
2.5.- NO en el neutrófilo	32
2.6.- Nucleótidos cíclicos. GMPc en el neutrófilo	33
2.7.- ET-1 y las células de la sangre	34
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	37

III. MATERIALES Y METODOS	39
I.- Estudios in vitro:	
1.1.- Estudios en neutrófilos:	
1.1.1.- Aislamiento de Neutrófilos	40
1.1.2.- Medida de los niveles de calcio libre citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) mediante fura-2	41
1.1.3.- Medida de liberación de anión superóxido	41
1.1.4.- Medida de liberación de β -Glucuronidasa	42
1.1.5.- Polimerización de filamentos de actina	42
1.1.6.- Incubaciones con L-arginina y análogos	43
1.1.7.- Marcaje de neutrófilos con $[^3H]$ -L-arginina	43
1.1.8.- Determinación del contenido de $[^3H]$ -L-citrulina	43
1.1.9.- Medida del GMPc	44
1.1.10.- Medida de captación de $[^3H]$ -L-arginina	44
1.1.11.- Marcaje de neutrófilos con ^{51}Cr	45
1.2.- Estudios en cultivos celulares:	
1.2.1.- Obtención y Cultivo de células endoteliales de aorta bovina	45
1.2.3.- Medida de adhesión de neutrófilos a células endoteliales en cultivo	47
1.2.4.- Medida de expresión de integrinas en el neutrófilo. Citometría de flujo	47
2.- Estudios in vivo:	
2.1.- Estudios en corazón aislado:	
2.1.1.- Sistema de Perfusión	48
2.1.2.- Corazón aislado	49
2.2.- Estudios en animal entero:	
2.2.1.- Medida de la actividad mieloperoxidasa	50
2.2.2.- Adhesión de neutrófilos a segmentos arteriales de conejo	51
3.- Análisis estadístico	52

IV. RESULTADOS 53

1.- Activación de los neutrófilos por ET-1

- 1.1.- Efecto de la ET-1 y el fMLP sobre la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en neutrófilos aislados 54
- 1.2.- Efecto de la ET-1 sobre la liberación de O_2^- 56
- 1.3.- Efecto de la ET-1 sobre la liberación de β -Glucuronidasa 57
- 1.4.- Efecto de la ET-1 sobre la polimerización de los filamentos de F-actina . 58

2.- Papel del sistema NO/GMPc en la activación de los neutrófilos por ET-1

- 2.1.- Efecto de los distintos mecanismos que generan NO/GMPc sobre el aumento de calcio inducido por ET-1 y otros mediadores 59
- 2.2.- Metabolismo de la $[^3H]$ -L-arginina 61
- 2.3.- Efecto de la ET-1 sobre la formación del GMPc 62
- 2.4.- Efecto de la ET-1 sobre la captación de L-arginina en neutrófilos aislados y células endoteliales 64

3.- Efecto de la ET-1 sobre la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular

- 3.1.- Efecto de la ET-1 sobre la adhesión de neutrófilos a células endoteliales en cultivo 68
- 3.2.- Caracterización de la adhesión inducida por ET-1 desde el punto de vista de las proteínas de adhesión 69
- 3.3.- Efecto de la ET-1 sobre la adhesión de neutrófilos a corazón aislado . . . 72
- 3.4.- Acumulación de neutrófilos in vivo en conejos infundidos con ET-1 . . . 74
- 3.5.- Adhesión de neutrófilos a segmentos arteriales 76

V.- DISCUSION 77

- 1.- La ET-1 activa los neutrófilos humanos 78
- 2.- La L-arginina inhibe el efecto de la ET-1 en los cambios de $[Ca^{2+}]_i$ en los neutrófilos 81
- 3.- El sistema NO/GMPc como retroregulador de la activación

de los neutrófilos por ET-1	82
4.- La ET-1 activa la adhesión de neutrófilos al endotelio	84
VI.- CONCLUSIONES	88
VII.- BIBLIOGRAFIA	91

I. Introducción

En el momento actual, existen datos consistentes que demuestran que sustancias producidas y liberadas por el endotelio interaccionan dinámicamente y contribuyen al mantenimiento del tono y la estructura de la pared vascular y a la homeostasis cardiovascular. Entre estos factores, las endotelinas (especialmente la endotelina-1 (ET-1)) y el óxido nítrico (NO), parecen desempeñar un papel primordial. Estos factores funcionan más como agentes locales que como hormonas circulantes y afectan a todos los tipos celulares del entorno vascular, incluyendo el propio endotelio (efecto autocrino), y las células de músculo liso vascular y de la sangre (efecto paracrino). Sin embargo, todavía se requiere una mejor comprensión del papel de estos mediadores en condiciones fisiológicas y en la patogénesis de las enfermedades vasculares. En esta tesis estudiamos el papel de la ET-1 en las interacciones entre los neutrófilos y el endotelio vascular y su regulación por el sistema óxido nítrico (NO)/guanosin monofosfato cíclico (GMPc).

1. EL ENDOTELIO VASCULAR.

1.1. ASPECTOS GENERALES. AGENTES VASOACTIVOS LIBERADOS POR EL ENDOTELIO.

El endotelio vascular es un tejido interactivo capaz de traducir estímulos químicos, mecánicos y celulares, implicándosele en funciones tales como el transporte de agua y solutos, la regulación de la concentración de lípidos del plasma, los procesos de coagulación, la inflamación y el crecimiento, proliferación y movilidad celulares⁽¹⁾. Desde el punto de vista del tono vascular, el endotelio participa en los fenómenos de vasoconstricción y vasodilatación mediante la producción y liberación de sustancias vasoactivas que describiremos con detalle en los apartados siguientes. La no trombogenicidad parece ser también una propiedad intrínseca de la membrana de las células endoteliales⁽²⁾, debido a su carga neta y a la presencia de ATPasa ectoplasmática que metaboliza los nucleótidos formados y liberados por las plaquetas en proceso de agregación⁽³⁾. Tanto las plaquetas estimuladas como las no estimuladas se adhieren con dificultad al endotelio intacto. Las propiedades anticoagulantes del endotelio se expresan en su capacidad de síntesis y liberación de sulfato de heparina, la producción de trombosmodulina y la síntesis de activador de plasminógeno⁽³⁾.

Desde el punto de vista de la estructura, el endotelio está formado por una monocapa de células con funciones compartimentadas y una orientación direccional, con diferentes regiones

de la superficie celular especializadas para proporcionar una superficie no trombogénica, para realizar contactos célula-célula o para contactar con la membrana basal subyacente. Debajo del endotelio se encuentra la capa media, que contiene células musculares lisas; éstas son células fusiformes y se colocan en varias capas alrededor de la circunferencia del vaso, con una función contráctil, y que comparten con las células endoteliales la producción y deposición de la matriz extracelular vascular.

AGENTES VASOACTIVOS LIBERADOS POR EL ENDOTELIO

Las células endoteliales producen mediadores que pueden actuar sobre las células del músculo liso vascular adyacente y que inducen la dilatación o contracción de éste.

La doble capacidad del endotelio de liberar mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores revela que el mismo tiene un complejo papel en la regulación del tono del músculo liso vascular, de la presión arterial y del flujo sanguíneo local (Tabla 1). Además, y como señalamos en el apartado anterior, el endotelio ejerce funciones reguladoras sobre la coagulación y la inflamación en cuya modulación también juegan un papel importante estos agentes vasoactivos de origen endotelial.

Tabla 1.- MEDIADORES VASOACTIVOS LIBERADOS POR O QUE ACTUANA TRAVES DEL ENDOTELIO VASCULAR

AGENTES VASODILATADORES	AGENTES VASOCONSTRICTORES
Producidos por el endotelio Adenosina (ADO) Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (BDHF) Prostaciclina (PGI ₂) Leucotrieno D ₄ (LTD ₄) Oxido Nítrico (NO) Prostaglandina E ₂ (PGE ₂) Trombina (THR)	Endotelina (ET-1) Factor activador de plaquetas (PAF) Tromboxano A ₂ (TXA ₂) Leucotrieno C ₄ (LTC ₄) Angiotensina II (Ang II)
Actúan a través del endotelio Histamina (HT) Acetilcolina (ACh) Bradiquinina (BK)	

Es muy probable que la alteración de la síntesis ó liberación de estas sustancias desempeñe un papel importante en la fisiopatología del vasoespasmo, la hipertensión, la inflamación, la arteriosclerosis y hasta en entidades aparentemente tan distantes funcionalmente como la neovascularización neoplásica y la diseminación de metástasis.

1.2. Agentes vasoconstrictores. La endotelina.

Estímulos humorales, neuronales y mecánicos son capaces de inducir la liberación de factores solubles desde la célula endotelial cuya última consecuencia va a ser la contracción del vaso. A estos factores solubles con capacidad contráctil se les llamó genéricamente factores constrictores dependientes del endotelio. El único de estos factores que se ha caracterizado hasta la fecha es un péptido de 21 aminoácidos llamado endotelina (ET)⁽⁴⁾. Las endotelinas son una familia de péptidos que, al menos, consta de cuatro isoformas: endotelina-1 (ET-1)(humana, porcina, de rata, canina), endotelina-2 (ET-2)(humana), endotelina-3 (ET-3) (humana, de rata) y un péptido intestinal vasoactivo o endotelina-β que solo se expresa en intestino de ratón⁽⁵⁾(Figura 1). Estos péptidos comparten una homología en la secuencia de un grupo de péptidos cardiotoxicos denominados sarafatoxinas, aisladas del veneno de Israeli burrowing asp (*Atractaspis engaddensis*), lo que sugiere un origen evolucionario común⁽⁶⁾. Tanto en su estructura como en su funcionalidad son, sin embargo, diferentes entre ellas.

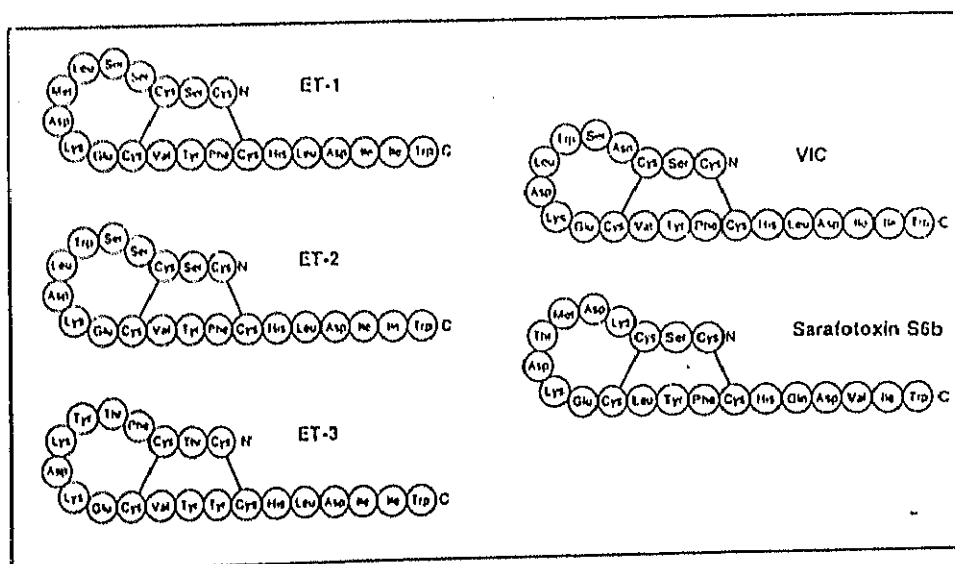


Figura 1. - Estructuras de las endotelinas

1.2.1. Síntesis y Estructura química.

La síntesis de las distintas isoformas de endotelina ocurre mediante la activación de tres genes diferentes localizados en los cromosomas 1, 6 y 20. Al igual que ocurre con otros péptidos, las endotelinas activas surgen tras el procesamiento proteolítico de una prohormona específica, la preproendotelina. Mediante una endopeptidasa, la preproendotelina da lugar a un molécula de 39 aminoácidos llamada "endotelina grande" cuyo paso a "endotelina madura" tiene lugar por una etapa proteolítica entre Tripsina-Valina, catalizada por una enzima de conversión de la ET-1⁽⁴⁾(Figura 2).

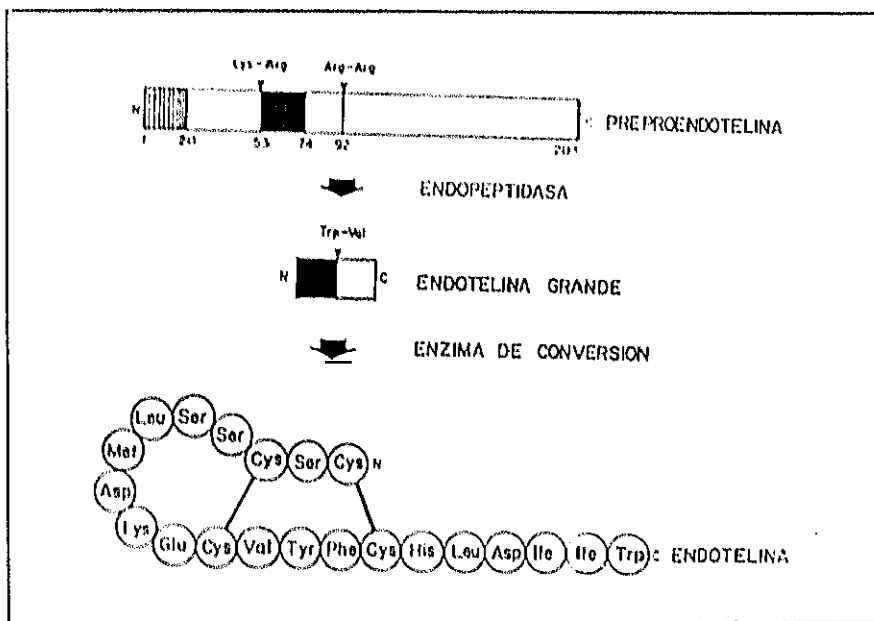


Figura 2.- Vía de síntesis de la endotelina. A partir de un precursor de 203 aminoácidos llamado preproendotelina y, mediante una endopeptidasa, se forma un péptido sin actividad biológica conocida (endotelina grande). Esta endotelina grande se transforma en la endotelina madura de 21 aminoácidos mediante una enzima de conversión distinta a la de angiotensina II.

La enzima convertidora de endotelina es una metaloendopeptidasa, que se inhibe por fosforamidón o pepstatina A, que aparece localizada tanto en la fracción particulada como soluble de las células endoteliales⁽⁴⁾. Una actividad similar de metaloendopeptidasa se ha descrito también en células de músculo liso vascular y en neutrófilos⁽⁷⁾. No se conocen acciones biológicas de la prohormona ni de sus fragmentos no endotelínicos.

La ET-1 de cerdo es una de las mejor caracterizadas. Tiene una masa molecular relativa de 2492 y comprende 21 residuos de aminoácidos con amino y carboxi terminal libre. Así mismo, contiene 4 residuos de cisteína que se encuentran formando dos puentes disulfuro intracatenarios. Se ha verificado que la ET-1 humana y porcina son idénticas, pero difieren de la de la rata en 6 aminoácidos^(8,9)

Es posible, con los datos de que se dispone hasta el momento, que la síntesis de ET-1 sea inducible y no constitutiva, ya que la activación de cultivos de células endoteliales con diferentes agentes (trombina, ionóforo, adrenalina) aumenta significativamente el ARNm de la preproendotelina. Así mismo, la producción de un estrés por rozadura mecánica de forma crónica en una monocapa de células endoteliales, parece inhibir la síntesis de ET-1. Por ello, todo parece indicar que la secreción de ET-1 está regulada por los niveles de transcripción del ARNm y no por almacenaje en gránulos y posterior secreción de los mismos⁽⁴⁾. En la mayoría de los casos, la inducción de la expresión del gen de endotelina requiere de 2 a 5 horas y es inhibida por óxido nítrico, péptido natriurético atrial (ANF), GMPc, cocultivo con células de músculo liso vascular o proteína quinasa A.

En células de la pituitaria posterior de rata se ha demostrado la presencia de endotelina en gránulos. Estos gránulos son liberados en condiciones de privación de agua, sugiriendo que la endotelina puede estar implicada en la regulación osmolar o del volumen del líquido extracelular⁽¹⁰⁾.

No solo la activación de la expresión del gen de la endotelina sino también la modulación de su degradación regula los niveles locales y circulantes de este péptido. La vida media de la endotelina circulante es menor de 30 segundos. Hasta la fecha se considera que la endotelina es catabolizada mediante tres mecanismos diferentes: a) hidrólisis mediante una endopeptidasa neutra; b) degradación en el interior de lisosomas; c) recaptación a nivel de la circulación pulmonar.

1.2.2. Receptores.

El rápido desarrollo en la investigación de la endotelina ha permitido la caracterización molecular y reconocimiento farmacológico de los receptores de endotelina, ET_A y ET_B⁽¹¹⁾, y en el desarrollo de compuestos selectivos para bloquear estos receptores. El subtipo ET_A une ET-1 y ET-2 pero no ET-3. El subtipo ET_B tiene una afinidad similar para todas las isoformas de endotelina. En algunas células como las células endoteliales o en órganos como el corazón se cree

que existiría un tercer subtipo, ET_C, que uniría solamente ET-3, aunque su existencia no está totalmente confirmada⁽¹²⁾.

Tanto ET_A como ET_B tienen una estructura homóloga a la de los receptores acoplados a proteínas que se unen a nucleótidos de guanina (Proteínas G), es decir, poseen siete dominios hidrofóbicos, sitios que pueden ser glicosilados en la zona N terminal extracelular y, en la parte embebida en el citosol, tienen lugares susceptibles de ser fosforilados por serina/treonina quinasas.

Desde 1991 se están desarrollando antagonistas de la ET-1, cuya aplicación está comenzando a producir los primeros resultados. Estos antagonistas se basan en estructuras de menor número de aminoácidos con homología secuencial a la ET-1^(13,14,15).

Mediante estudios de biología molecular en las células que componen el vaso sanguíneo, se ha demostrado la existencia de receptores de tipo ET_A en las células de músculo liso vascular⁽²⁴⁾. En la célula endotelial se expresa el receptor tipo ET_B, acoplado a la liberación de óxido nítrico⁽²⁵⁾.

En otros tipos celulares como los fibroblastos y los macrófagos, se ha demostrado también la existencia de receptores de tipo ET_A^(26,27).

Tabla 2.- Antagonistas selectivos y no selectivos de los receptores de ET-1.

Antagonistas ET _A	Antagonistas ET _B	Antagonistas no selectivos
BQ-123 ⁽¹⁶⁾ FR-139317 ⁽¹⁶⁾ 50-235 ⁽¹⁷⁾ TTA-386 ⁽¹⁷⁾	IRL 1038 ⁽¹⁷⁾	[Thr ¹⁸ ,MeLeu ¹⁹]-ET-1 ⁽¹⁸⁾ PD1145065 ⁽²⁰⁾ Ro46-20005 ⁽²²⁾

Los receptores de ET-1 no solo median la respuesta contractil en el vaso sino que recientemente se han demostrado otros efectos como son la proliferación de células endoteliales, de músculo liso y mesangiales⁽²⁸⁾, y la síntesis de colágeno⁽²⁹⁾

1.2.3. Señales celulares activadas por endotelina.

Los mecanismos de activación celular de la endotelina son de dos tipos: uno inmediato, como son los mecanismos de contracción y secreción, y otro más prolongado, en los que

podríamos englobar todos los que inducen la proliferación celular.

Muchos estudios demuestran que ambos tipos de receptores de ET-1 están acoplados a fosfolipasa C mediante una proteína G^(28,30). Una vez que la endotelina se encuentra unida a su receptor, se activan uno o varios tipos de proteínas G, que traducen la señal postreceptor. En las células mesangiales glomerulares y en las de músculo liso vascular, la ET-1 estimula la actividad fosfolipasa C mediante una proteína G que es parcialmente sensible a toxina de pertussis. No obstante, en células de músculo liso vascular obtenidas de otras arterias, la endotelina utiliza proteínas G insensibles a toxina pertussis. Estas diferencias dan una idea de la heterogeneidad y probablemente la multiplicidad de las proteínas G que se encuentran acopladas a los receptores de ET-1, transmitiendo las señales de ésta al interior celular (Figura 3).

En líneas generales, en células contráctiles como las de músculo liso vascular o mesangiales, son dos los agentes principales en los mecanismos de activación celular de la ET-1: 1) el calcio citosólico, mensajero celular que al unirse a la calmodulina activa a la proteína quinasa que fosforila la cadena ligera de la miosina, iniciándose la contracción y 2) la proteína quinasa C (PKC), enzima que en su forma activa fosforila un gran número de proteínas responsables del mantenimiento de la contracción. La activación de ambos mecanismos se inicia con la unión de la endotelina a su receptor específico de membrana y consiguiente estimulación de una fosfodiesterasa, la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza a un tipo especial de fosfolípidos, los fosfoinosítidos, produciendo dos mensajeros: el inositol trisfosfato (IP₃), encargado de liberar el calcio contenido en el retículo endoplasmático, y el diacilglicerol (DAG) que activa a su vez a la PKC^(31,32,33). La ET-1 induce una estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos, aumenta los niveles de IP₃ y también los de diacilglicerol^(34,35). El aumento de IP₃ conlleva la elevación transitoria en los niveles de calcio por liberación desde orgánulos subcelulares. Por su lado, el diacilglicerol estimula la PKC, que debe tener un papel importante en el mantenimiento de la tensión, puesto que la inhibición de la actividad de la PKC en células de músculo liso vascular bloquea también la contracción por ET-1⁽³⁵⁾. La PKC está también implicada en la terminación de la señal celular inducida por la endotelina. La activación prolongada de esta proteína quinasa, disminuye la actividad fosfolipasa C y la señal de calcio inducida por las endotelinas.

Además de las señales celulares que hemos descrito anteriormente, la endotelina activa otra serie de vías enzimáticas como las de las fosfolipasas D y A₂⁽³⁶⁾. La activación de esta última incrementa los niveles de derivados del ácido araquidónico y favorece, en células como la

mesangial, la liberación de otros activadores celulares como el factor activador de las plaquetas (PAF), que lleva a una segunda oleada de activación celular⁽³⁷⁾.

El receptor de tipo B de las células endoteliales media la producción de NO y PGI₂ y parece ser el responsable de la vasodilatación inicial tras un bolo de ET-1.

La endotelina activa, así mismo, distintos transportadores iónicos como el antiportador Na⁺/H⁺, que contribuye a su actividad mitogénica en células como las mesangiales o el endotelio vascular⁽³⁸⁾ o el cotransporte Na⁺,K⁺, Cl⁻⁽³⁹⁾.

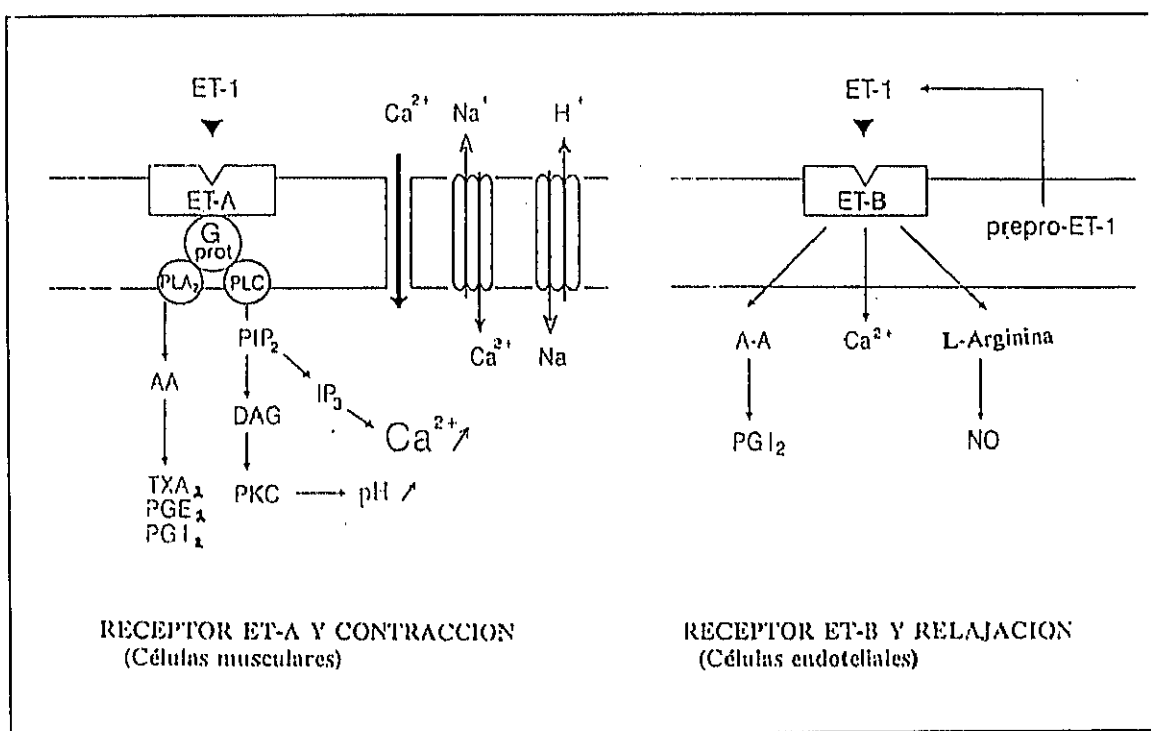


Figura 3.- Receptores de ET y señales intracelulares activadas. El receptor A se localiza en el músculo liso vascular y produce vasoconstricción, está acoplado a proteínas G y activa la fosfolipasa A₂ (PLA₂) que activa la producción de PAF y la vía del Ácido araquidónico (AA) con formación de metabolitos de ciclooxigenasa. También activa la fosfolipasa C (PLC) con elevación intracelular de inositol fosfato (PIP₂) y diacilglicerol (DAG) el cual estimula la proteína quinasa C (PKC), acompañándose de un aumento en la [Ca²⁺]_i. El receptor de tipo B de células endoteliales media la producción de NO y PGI₂, causando vasodilatación.

1.2.4. Efectos fisiológicos.

Puesto que la ET-1 en principio se definió como una sustancia vasoconstrictora, los

principales sistemas de estudio han sido fragmentos de arterias y células de músculo liso en cultivo. Se sabe que la ET-1 contrae de forma dosis-dependiente segmentos de diversas arterias, como por ejemplo la aorta de rata, mesentérica de conejo, mesentérica, femoral y renal de perro, coronaria de cerdo y ramas arteriales pulmonares y mesentérica de humanos⁽⁴⁾. La concentración a la cual la ET-1 ejerce el 50% de sus efectos máximos se estima que es de $4 \pm 2.2 \times 10^{-10} \text{M}$, a diferencia del resto de los péptidos vasoconstrictores (vasopresina, angiotensina II) que son del orden de 10^{-9}M , convirtiendo a la endotelina en el más potente vasoconstrictor hasta hoy conocido⁽⁴⁾.

La acción de la ET-1 además de ser más efectiva, es mucho más persistente que las contracciones inducidas por otros agentes presores caracterizados hasta ahora^(40,4), siendo sus efectos similares a la de otros péptidos vasoconstrictores, produciendo mayor contracción a dosis más bajas y la tensión generada perdura a pesar de ser eliminada la ET-1 del medio de incubación⁽⁴⁾. Estudiando la unión específica de la ET-1 a sus receptores en células de aorta de rata, en relación al tiempo de mantenimiento de la contracción, Hirata y cols. han demostrado que el complejo ET-receptor es resistente a la disociación. Se ha especulado con que este tipo peculiar de unión pueda influir en la duración del efecto de la ET-1, pero no hay pruebas definitivas al respecto^(41,9).

La respuesta sistémica a la ET-1 parece compleja y aún no está muy claro su papel fisiológico. Existen diversos estudios sobre el papel desarrollado por la ET-1 en la presión arterial. La infusión intravenosa de ET-1 induce un efecto presor de duración mayor a 90 minutos⁽⁴⁾, con un marcado efecto renal, induciendo disminución del filtrado glomerular y del flujo plasmático renal así como una contracción mesangial significativa^(42,37). Por otro lado Wright y cols. han visto que, en ratas espontáneamente hipertensas y tratadas con un bloqueante ganglionar, al inyectarles ET-1 la presión arterial sistémica sufre inicialmente una disminución significativa, que dura unos 40 segundos, después de los cuales aumenta por encima de los niveles basales⁽⁴³⁾. Lipton y cols también han observado este efecto hipotensor en gatos, inmediatamente después de la administración de ET-1⁽⁴⁴⁾.

La fase hipotensora provocada por la ET-1, se debe a una disminución de la resistencia vascular periférica⁽¹⁾. El N-monometil-L-Arginina (L-NMMA), un análogo competitivo de la L-Arginina, que bloquea la formación de NO, es capaz de evitar el efecto hipotensor inicial de la ET-1 sugiriendo que éste depende de la liberación de este gas^(45,46,47). Como se menciona anteriormente, el receptor de endotelina que se expresa en el células endoteliales es de tipo ET-B

ligado a la formación de NO y prostaciclina lo que puede explicar el efecto vasodilatador transitorio de la ET-1 cuando se infunde a órganos intactos o en el organismo. Hay que tener en cuenta que en condiciones fisiológicas las propiedades vasodilatadoras dependientes del endotelio de la endotelina deben ser las más importantes; de hecho se ha demostrado en ratones recién nacidos, deficientes en ET-1, que la presión arterial está elevada⁽⁴⁸⁾.

Se conoce muy poco del catabolismo de este péptido, excepto su significativa degradación a nivel pulmonar. En bioensayos del efluente de pulmones perfundidos se ha demostrado que más del 60% de la ET-1 administrada se degrada en un único paso por el pulmón. La incubación de ET-1 con suero o sangre no inhibe sus propiedades vasoconstrictoras, lo que indica su resistencia a degradarse por peptidasas circulantes o por células de la sangre⁽⁴⁵⁾.

Han sido varios los trabajos realizados con el fin de determinar la implicación de la ET-1 en distintas patologías. Los niveles circulantes de ET-1 son muy bajos lo que indica que normalmente se produce poco péptido debido a la ausencia de estímulos y particularmente a la presencia de potentes mecanismos inhibitorios⁽⁴⁹⁾. Existen tres mecanismos inhibitorios: 1) Inhibición dependiente de GMPc^(50,51); 2) Inhibición dependiente de AMPc⁽⁵²⁾; 3) Factor inhibitorio producido por las células de músculo liso vascular⁽⁵³⁾. La mayoría de la ET-1 producida por células endoteliales, se libera hacia las células de músculo liso vascular más que hacia el lumen, por lo que los niveles circulantes de ET-1 solo reflejan pobremente la producción vascular local del péptido. Bajo ciertas condiciones, la ET-1 induce también la liberación de NO y/o prostaciclina por las células endoteliales lo que puede representar un mecanismo de retroalimentación negativo⁽²⁵⁾. En la tabla 3, adaptada de la reciente revisión de Miller y cols⁽⁵⁴⁾, puede verse una lista de situaciones patológicas en las que se ha observado un aumento de ET-1.

Tabla 3.- Algunas condiciones clínicas en las cuales se pueden encontrar niveles circulantes de ET-1 elevados

CONDICIONES CON NIVELES ELEVADOS DE ENDOTELINA-1
Hipertensión esencial
Hipertensión pulmonar
Cardiomiopatía
Infarto agudo de miocardio
Isquemia coronaria
Aterosclerosis
Uremia
Diabetes mellitus
Embarazo
Cirugía
Septicemia
Trauma
Ejercicio

Como se observa en esta lista muchos son las situaciones fisiopatológicas en las que se ha demostrado aumento en la concentración de ET-1 circulante. El papel que ejerce la ET-1 en la génesis y desarrollo de estas patologías está aún por definirse. Existen algunos estudios en los que se demuestra que los niveles circulantes de ET-1 no están aumentados en la hipertensión humana⁽⁴⁹⁾. Para definir mejor el papel de la ET-1 en la hipertensión se requieren estudios en los que se utilicen antagonistas específicos del receptor de ET-1.

Se han observado niveles elevados de ET-1 tanto en animales como en pacientes con fallo cardiaco^(55,56), e infarto de miocardio. Particularmente se encuentran niveles elevados de ET-1 en el shock cardiogénico y también en la terapia trombolítica para una oclusión coronaria⁽⁵⁷⁾. Existen datos *in vitro* que sugieren que la ET-1 es arritmogénica pero no existen datos en la clínica que confirmen esto⁽⁵⁸⁾. No está claro, sin embargo, si los niveles sistémicos de ET-1 reflejan los niveles alcanzados en los tejidos de un órgano isquémico, y si su papel es más autocrino o paracrino.

1.3. Agentes vasodilatadores. Oxido Nítrico.

La vasodilatación es una parte integrante en la respuesta inflamatoria, ya que incrementa el flujo sanguíneo y facilita el transporte de leucocitos al sitio de acción. La administración de una sustancia vasodilatadora junto a un quimioattractante produce una mayor acumulación de leucocitos que la que ocurre al administrar solamente el factor quimiotáctico⁽⁵⁹⁾.

Cuando en 1980, Furchgott y Zawadzki⁽⁶⁰⁾ descubrieron que la relajación de la aorta de conejo aislada inducida por la acetilcolina dependía estrictamente de la presencia del endotelio vascular, se concluyó que la relajación producida por la acetilcolina resultaba de la liberación de una sustancia por parte de las células endoteliales, a la que se llamó factor relajante dependiente del endotelio (EDRF), y que ha sido identificada como óxido nítrico (NO)^(61,62).

1.3.1. Síntesis de NO.

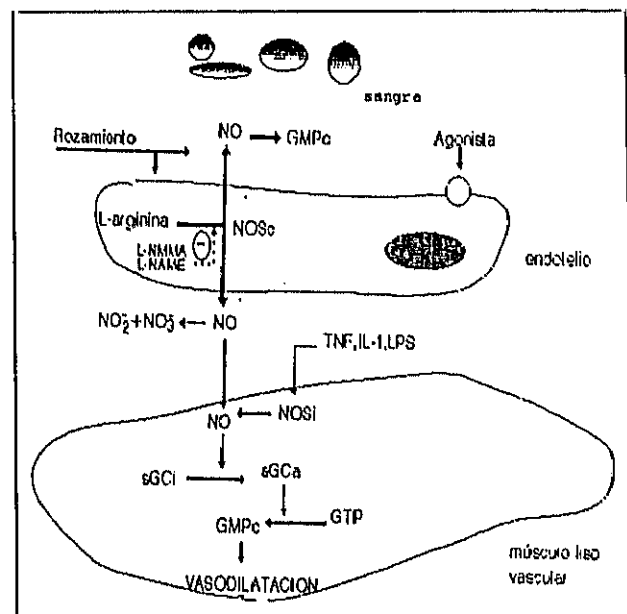
El NO se sintetiza por la conversión de L-arginina a L-citrulina^(63,64,65,66), mediante la oxidación del átomo de nitrógeno terminal del grupo guanidino, utilizando como enzima la NO sintasa (NOS)⁽⁶⁷⁾. El paso inicial en el metabolismo de la L-arginina es la formación de N-hidroxi-L-arginina⁽⁶⁸⁾.

El aminoácido L-arginina además de ser sustrato para la síntesis de NO tiene también un papel importante en la síntesis de las proteínas orgánicas y en el ciclo de la urea⁽⁶⁹⁾.

La arginina es transportada a través de las membranas de la célula endotelial por el sistema y^+ , el cual es Na^+ independiente y no sensible a $pH^{(70)}$. En algún caso como en el riñón y en el borde en cepillo de las membranas intestinales, el sistema de transporte y^+ puede ser parcialmente Na^+ dependiente⁽⁷⁰⁾.

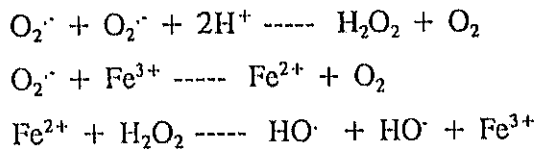
Es importante resaltar que análogos de la L-arginina, incluido su isómero, la D-arginina, no actúan como sustrato para la síntesis de NO⁽⁶⁵⁾, y que incluso la pueden inhibir, como por ejemplo el N^ε-monometil-L-arginina (L-NMMA)^(71,72,46) o el N^ω-nitro-L-arginina (N^ωNLA).

Figura 4.- Síntesis de óxido nítrico en la pared vascular. El NO endotelial se sintetiza a partir de la L-arginina mediante la NO sintasa de forma constitutiva (NOS_c). Sus productos de degradación son nitritos y nitratos que se liberan al medio. Además del endotelio, el músculo liso vascular y el macrófago expresan NOS inducible (NOS_i) en respuesta a citoquinas: factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina-1 (IL-1) o lipopolisacárido bacteriano (LPS). El NO estimula la guanilato ciclasa inactiva (GC_{si}) y pasa a forma activa (GC_{sa}) generando GMPc, el cual ejerce su acción vasorelajante y antiagregante.



El NO es altamente inestable y con rapidez (3-5 seg) se convierte en NO₂⁻ y NO₃⁻ en soluciones oxigenadas. Los radicales libres de O₂ y en especial el anión superóxido, O₂⁻, catabolizan el NO. La superóxido dismutasa es capaz de enlentecer esta degradación, comprobándose así indirectamente el papel que cumple el anión superóxido, como catabolizador del NO. Los radicales libres de oxígeno representan estados intermedios de la reducción electroquímica del agua, son inestables y altamente reactivos⁽⁷³⁾. Se generan durante la oxidación

de purinas mediante la xantina oxidasa⁽⁷⁴⁾ y actualmente se sabe que otras enzimas entre las que se incluyen la NOS, generan radicales libres como resultado del metabolismo oxidativo⁽⁷⁵⁾. Los principales radicales libres de O₂ son el anión superóxido (O₂^{·-}), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y el radical hidroxilo (OH[·]). El H₂O₂ se le suele considerar como radical libre por ser el metabolito intermediario entre O₂^{·-} y OH[·]. A pH fisiológico el O₂^{·-} dismuta a H₂O₂; y en presencia de iones metálicos como Fe³⁺, genera el radical hidroxilo a través de la reacción de Haber-Weiss:



Estos radicales causan toxicidad en los tejidos por lo que las células desarrollan mecanismos antioxidantes para eliminar el ion superóxido y el peróxido de hidrógeno y así limitar la formación del radical hidroxilo. Estos mecanismos incluyen, superóxido dismutasa (SOD) para el ion superóxido y peroxidasas y catalasas para el peróxido de hidrógeno. Otro mecanismo antioxidante es prevenir la existencia de iones metálicos en el ciclo redox (lactoferrina, ferritina). A pesar de estos mecanismos antioxidantes, existen muchas situaciones patológicas en las que están implicados estos radicales libres de O₂.

Otros mecanismos pueden inhibir los efectos vasorelajantes del NO. Los radicales Fe²⁺ de la hemoglobina se unen y secuestran la molécula del NO y el azul de metileno actúa inhibiendo la guanilato ciclasa y por consiguiente la producción de GMPC⁽⁷⁶⁾. La importancia fisiopatológica de estos mecanismos no ha sido aun completamente dilucidada, pero es posible que su papel sea importante en los efectos vasoconstrictores de la hemoglobina libre y la mioglobina.

1.3.2. NO Sintasa.

El NO es sintetizado por una familia de enzimas denominadas NO sintasas (NOS), a partir del aminoácido L-arginina.

En esta reacción, la L-arginina, O₂ y NADPH son cosustratos; FMN, FAD, hemo y tetrahydrobiopterina son cofactores y el NO y la citrulina son coproductos de la reacción catalizada por la NOS que es una dioxigenasa.

Existen dos isoformas de NO sintasas en el vaso: Constitutiva (NOS_c), expresada basalmente en las células endoteliales y cuya actividad es regulada por Ca²⁺/Calmodulina, y una isoforma inducible (NOS_i), localizada en las células de músculo liso vascular, que no se expresa

en condiciones fisiológicas y cuya expresión aumenta cuando se estimulan las células de músculo liso vascular con algunas citoquinas (Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interleuquina 1 β (IL-1 β), endotoxinas y AMPc. Las similitudes y diferencias entre ambas isoformas de la NOS se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.- *Similitudes y diferencias entre las isoformas de NOS.*

CONSTITUTIVA	INDUCIBLE
Membrana/Citosólica	Citosólica
Dependiente de NADPH	Dependiente de NADPH
Dioxigenasa	Dioxigenasa
Inhibible por análogos de L-arginina	Inhibible por análogos de L-arginina
Dependiente de Ca ²⁺ /Calmodulina	Independiente de Ca ²⁺ /Calmodulina
Libera picomoles NO	Libera nanomoles NO
Liberación corta	Liberación prolongada
No se afecta por glucocorticoides	Inducción inhibible por glucocorticoides

Entre otras, han sido purificadas NOS de rata⁽⁷²⁾, cerdo, vaca, cerebelo y macrófagos de ratón⁽⁷⁷⁾, neutrófilos⁽⁷⁸⁾, endotelio bovino⁽⁶⁵⁾ y plaquetas⁽⁷⁹⁾ (Tabla 5). En los neutrófilos de rata, como comentaremos más tarde, se ha observado la existencia de NOS de tipo inducible⁽⁸⁰⁾; sin embargo, los datos sobre la presencia de NOS en neutrófilos humanos son controvertidos^(78,81).

Tabla 5.- *Localización de las isoformas de NOS en el organismo.*

NOSc	NOSi
Células endoteliales ⁽⁶³⁾	Células endoteliales ⁽⁷⁷⁾
Neuronas centrales ⁽⁸³⁾	Hepatócitos ⁽⁸⁴⁾
Neutrófilos ⁽⁷⁸⁾	Células de Carcinoma ⁽⁸⁴⁾
Plaquetas ⁽⁷⁹⁾	Fibroblastos ⁽⁸⁴⁾
Células de la mácula densa renal ⁽⁸⁵⁾	Células de músculo liso vascular ⁽⁸⁶⁾ y mesangial ⁽⁸⁵⁾
Células de la médula adrenal ⁽⁸⁵⁾	Macrófagos ⁽⁸²⁾
Células β del páncreas ⁽⁸⁴⁾	Neutrófilos de inflamación ⁽⁸⁰⁾

1.3.3. Guanilato ciclasa. GMPc.

El NO posee un efecto vasorrelajante mediado a través de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble, localizada en las células del músculo liso vascular, promoviendo la elevación del GMPc⁽⁸⁸⁾.

La guanilato ciclasa es una enzima que se encuentra en la membrana plasmática, citoplasma y citoesqueleto celular, que cataliza la formación de GMPc a partir del guanosín trifosfato (GTP)⁽⁸⁸⁾. La guanilato ciclasa tiene dos isoformas: a) particulada o asociada a membrana, que es activada por un mecanismo receptor-específico, por agentes como el péptido natriurético atrial y la toxina de *E. Coli*⁽⁸⁹⁾; b) soluble, que es activada por el NO o por compuestos que contienen NO en su molécula, como los nitrovasodilatadores, nitroprusiato sódico (NPS), o nitroglicerina⁽⁸⁹⁾. El NO activa la guanilato ciclasa soluble y consecuentemente aumenta la síntesis de GMPc⁽⁸⁸⁾. El mecanismo por el cual el GMPc vasodilata parece relacionado con una inhibición de la movilización intracelular de Ca^{2+} y de la contracción del músculo liso⁽⁸⁸⁾. Las acciones del GMPc podrían sin embargo, exceder el marco de la mera vasodilatación y ejercer diversos efectos adicionales. Los neutrófilos humanos poseen guanilato ciclasa de tipo soluble sensible a NO⁽⁹⁰⁾.

1.3.4. Efectos fisiológicos del NO.

El NO actúa por la transferencia directa célula a célula, cuyas membranas atraviesa rápidamente, por lo que debe considerarse como una sustancia paracrina⁽⁷⁶⁾. Además, hay que tener en consideración la corta vida media de esta molécula, menor de 3 segundos, lo que le impide su acción a distancia. Se ha descrito que el NO puede prolongar sus efectos mediante su unión a grupos sulfidrilos⁽⁹¹⁾.

La formación de NO por las células endoteliales es estimulada por trombina, ATP, acetilcolina, bradikina, TNF_{α} e histamina, entre otros factores. El efecto mejor conocido del NO está dirigido hacia las células contráctiles localizadas en el exterior endotelial, tales como la célula de músculo liso vascular y la célula mesangial glomerular, y está mediado vía la estimulación de la guanilato ciclasa soluble con elevación de guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc)^(88,92). Entre estos últimos se encuentran también los fármacos dadores de NO a partir de su propia molécula, como el nitroprusiato sódico, la nitroglicerina o la molsidomina. Además de la actividad vasorrelajante del NO/L-Arg⁽⁹³⁾ se ha demostrado que esta molécula es capaz de inhibir la agregación plaquetaria⁽⁷⁹⁾. Distintas sustancias

liberadas por las plaquetas, tales como el ADP, la serotonina, o la trombina son capaces de inducir la síntesis de NO por la célula endotelial; este mecanismo podría significar una autorregulación negativa, en la cual algunos metabolitos producidos durante el proceso de agregación generarían un compuesto, el NO, que actuaría a su vez inhibiendo la agregación sucesiva de nuevas plaquetas y facilitaría la disgregación de los trombos formados. Además, mediante su efecto vasorrelajante, el NO incrementaría el flujo sanguíneo local, lavando así los agregados formados y protegiendo la integridad del lecho vascular. Estos efectos plaquetarios pueden ser de importancia crítica en situaciones de isquemia/reperfusión, ya que de su nivel de funcionamiento podría depender la aparición, extensión o lisis de coágulos formados localmente en el territorio isquémico.

Actualmente se sabe que el NO es sintetizado además de por las células endoteliales, por los macrófagos^(83,78), neutrófilos⁽⁷⁸⁾, células de Kupffer⁽⁹⁴⁾ y tejido neural⁽⁸³⁾. Este hecho aumenta la posibilidad de interacciones y multiplica las posibles funciones del NO en fisiología y fisiopatología.

En el sistema cardiovascular, el EDRF/NO contribuye a la regulación del flujo sanguíneo regional y de la hemodinámica sistémica⁽⁷⁶⁾, modulando la vasorrelajación de arterias grandes y pequeñas, así como de las venas^(92,95,96,97), se ha demostrado recientemente, que estímulos inflamatorios pueden inducir la actividad de la NOS inducible tanto en endotelio⁽⁸⁷⁾ como en células de músculo liso vascular⁽⁸⁶⁾ y en macrófagos⁽⁸²⁾. La cantidad de NO producida por la NOS inducible es mayor que la producida por la NOS constitutiva, por lo que el NO de origen vascular también tendría un papel en la hipotensión asociada con la administración de LPS⁽⁹⁸⁾ o citoquinas⁽⁹⁹⁾. Otros efectos del NO de origen vascular son: la inhibición de la adhesión de leucocitos⁽¹⁰⁰⁾, inhibición de la generación de endotelina⁽⁵⁰⁾, e inhibición de la proliferación de células de músculo liso vascular⁽¹⁰¹⁾. Recientemente se ha implicado también al NO en la modulación de la síntesis de distintas proteínas de matriz extracelular por las células endoteliales y de músculo liso vascular^(102,103).

2. EL NEUTROFILO

2.1. MORFOLOGIA

Es un conocimiento clásico que los leucocitos se dividen en granulocitos, monocitos y linfocitos. Estos tipos tienen marcadas diferencias morfológicas y en motilidad.

Los granulocitos, que comprenden a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos, tienen núcleo lobulado, su citoplasma contiene numerosos gránulos distintos entre sí y se diferencian según sea

Los receptores expresados en el neutrófilo existen en varias formas. Pueden estar unidos a proteínas G y al citoesqueleto. Los neutrófilos expresan receptores para el péptido quimiotáctico fMLP, el factor del complemento C5a, receptores de inmunoglobulinas. Otros receptores importantes son los de Factor activador de plaquetas (PAF), Interleuquina-8 (IL-8) y Leucotrieno B₄ (LTB₄). El receptor del neutrófilo no ocupado se encuentra acoplado a una proteína G inactiva (G_i). Cuando un ligando específico se une al receptor se producen cambios conformacionales en esta proteína (R*) (Figura 5) que se acompañan por una activación de la proteína G⁽¹⁰⁴⁾. Los quimioattractantes como el fMLP, LTB₄, PAF, C5a etc estimulan la actividad GTPasa en membranas aisladas⁽¹⁰⁵⁾. La activación de la proteína G se bloquea por Toxina Pertussis⁽¹⁰⁶⁾ que ADP-ribosila la subunidad α de la G_i del sistema adenilato ciclasa y también una proteína 40-41KD de la membrana plasmática de los neutrófilos⁽¹⁰⁷⁾. La estimulación de los neutrófilos por nucleótidos de guanina, forbol 12-mirístico 13-acético (PMA) y calcio no se inhibe por toxina pertussis lo que sugiere que una segunda proteína G puede estar envuelta en la transducción de la señal⁽¹⁰⁸⁾.

En el proceso de activación de la proteína G esta involucrado el Guanosin trifosfato (GTP) que se une a la proteína G y la activa (G_i*). Esta proteína G interacciona con la fosfolipasa C y la activa (PLC*). La fosfolipasa C hidroliza el fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) y fosfatidil inositol-4-monofosfato y produce el segundo mensajero inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El IP₃ interacciona con un receptor intracelular específico y estimula la liberación de iones calcio⁽⁶¹⁾ desde unos orgánulos denominados *calciosomas*⁽¹⁰⁹⁾. Este aumento está potenciado por la entrada de Ca²⁺ del medio extracelular. El DAG activa la proteína quinasa C (PKC) provocando su translocación desde el citosol a la membrana plasmática. El neutrófilo posee gran cantidad de PKC⁽¹¹⁰⁾, presente como varias isoenzimas de las cuales las mas comunes son la β y la γ ⁽¹¹¹⁾. La activación de la PKC no es un requerimiento necesario para la activación del neutrófilo ya que los estudios con inhibidores de PKC demuestran que no se bloquea toda la respuesta de los estímulos⁽¹¹²⁾; además los neutrófilos contienen otros tipos de quinasas que están envueltas en la activación celular como son quinasa dependiente de GMPc, tirosina quinasas, H4 Histona quinasa, y fosfatasa. El PMA se utiliza para investigar la transducción de señal vía PKC en los neutrófilos. Cuando los neutrófilos son estimulados con PMA, el estado de fosforilación de varias proteínas se modifica⁽¹¹³⁾.

Otras vías de activación celular en el neutrófilo son: la fosfolipasa D que utiliza la fosfatidilcolina para producir ácido fosfatídico, que interviene en la activación de la respiración; y la fosfolipasa A₂ que está presente en los gránulos y en la membrana plasmática de los neutrófilos

y cuya activación produce ácido araquidónico⁽¹¹⁴⁾ el cual a su vez sirve de estímulo para los neutrófilos⁽¹¹⁵⁾. El ácido fosfatídico y el DAG pueden ser interconvertidos mediante la acción de la ácido fosfatídico fosfolidrolasa y la diacilglicerol quinasa.

La concentración de calcio en neutrófilos en reposo se mantiene en niveles submicromolares mediante la bomba Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática⁽¹¹⁶⁾. Después de estimulación, el calcio intracelular aumenta casi inmediatamente desde $0.1 \mu\text{M}$ a $1 \mu\text{M}$ ⁽¹¹⁷⁾. La elevación del calcio citoplasmático va a activar proteínas quinasas dependientes de calcio-calmodulina, PLA_2 y proteínas que se unen a actina⁽¹¹⁸⁾ y va a producir la fusión de la membrana de los gránulos con la membrana plasmática para producir degranulación. El calcio intracelular también abre canales inespecíficos que permiten el flujo de Na^+ y K^+ ⁽¹¹⁹⁾; sin embargo, el papel específico del flujo de estos iones y de la elevación de calcio inducida por estímulos, no está bien determinado, dado que muchas respuestas celulares en el neutrófilo tienen lugar en medios libres de Na^+ y calcio⁽¹²⁰⁾.

2.2.1.- Polimerización de actina.

Los agentes quimioatácticos estimulan la locomoción de los neutrófilos que comprende una serie de procesos complejos como son la formación de pseudópodos, mantenimiento de la integridad celular y liberación de las enzimas necesarias para el pasaje transendotelial. La actina es una de las proteínas del citoesqueleto más abundantes, y participa tanto en la movilidad celular como en la estructura de la matriz del citoplasma. La formación de pseudópodos en los neutrófilos inducida por quimioattractantes, se correlaciona en el tiempo y en el espacio con la polimerización de la actina. Los máximos niveles alcanzados de F-actina ocurren a los 15-60 segundos tras estimulación con un agente quimiotáctico o un éster de forbol. Los pseudópodos formados se tiñen con NBD-Falacidina que se une selectivamente a la F-actina. Del estado de polimerización en que se encuentre la actina, van a depender muchas funciones celulares como son los cambios de forma, adhesión, migración, secreción de gránulos y fagocitosis.

Los gránulos están separados de la membrana plasmática por filamentos del ectoplasma en los neutrófilos en reposo. Cuando se estimula la superficie celular del neutrófilo con un agente quimiotáctico, se produce una movilización de calcio especialmente en la periferia, este aumento activa la gelsolina, otro de los microfilamentos que constituyen el citoesqueleto, por lo que se acortan los filamentos de actina disminuyendo la viscosidad en esa área lo que permite que los gránulos tengan acceso a la superficie de la membrana plasmática, facilitando así la degranulación⁽¹²¹⁾. Este

es el mecanismo de acción que utilizan las citocalasinas para facilitar la secreción de los gránulos y bloquear la locomoción, ya que estos alcaloides pueden destruir los filamentos de actina, inhibiendo su polimerización.

2.3 CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Las funciones principales de los neutrófilos son la fagocítica y la bactericida como parte esencial en los mecanismos de defensa del organismo contra la infección. Esta función está muy relacionada con la de los linfocitos y macrófagos.

Para realizar sus funciones, el neutrófilo sufre un proceso de adhesión al endotelio y movilidad para atravesar la barrera endotelial y llegar al foco inflamatorio.

2.3.1.- Quimiotaxis y Movilidad.

Los factores quimiotácticos que son generados por la interacción de proteínas plasmáticas con antígenos ó agentes patógenos atraen a los neutrófilos de la sangre a los sitios de infección. La difusión de estos factores crea un gradiente químico que dirige la migración de los neutrófilos hacia la fuente que produce el factor quimiotáctico. El plasma también produce anticuerpos y factores de complemento que cubren al microorganismo en un proceso denominado *opsonización*. Los neutrófilos ingieren e incluyen a los microorganismos opsonizados en una vesícula (*fagosoma*), en la cual descargan su contenido granular (*degranulación*). Los neutrófilos generan metabolitos activos del oxígeno como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno que contribuyen a matar al microorganismo. Los enzimas de los gránulos junto con los metabolitos de oxígeno pueden liberarse también al fluido extracelular donde pueden causar daño al tejido. Este efecto secundario puede ser una causa importante de inflamación en los tejidos y de daño para el organismo.

2.3.2.- Adhesión. Aspectos Generales.

Los neutrófilos tienen una mayor capacidad de adhesión durante los procesos de quimiotaxis y fagocitosis⁽¹²²⁾. Los neutrófilos circulantes cuando se exponen a estímulos exógenos aumenta su capacidad de adhesión de unas células a otras y a otro sustrato. Se ha demostrado que los neutrófilos adheridos a una superficie están "primados" ó sensibilizados y tienen diferentes propiedades funcionales

comparando con las células en suspensión⁽¹²³⁾. Cuando los neutrófilos están en suspensión, se agregan en respuesta a un factor quimiotáctico, un proceso que es distinto al de la adhesión.

Los neutrófilos abandonan frecuentemente el torrente circulatorio para ejercer su acción en los tejidos, para lo cual deben adherirse al endotelio vascular. La adhesión de células de la sangre, como neutrófilos o plaquetas posee un papel importante en procesos como la hemostasia⁽¹²⁴⁾, trombosis, cicatrización de heridas, infecciones⁽¹²⁵⁾, procesos inflamatorios⁽¹²⁶⁾, respuestas inmunológicas y reparación de tejidos dañados⁽¹²⁷⁾, de tal forma que en el sistema inmunológico los leucocitos interactúan entre sí y con el endotelio vascular, así como con componentes de matrices extracelulares, cambiando rápida y transitoriamente del estado no adhesivo al adhesivo⁽¹²⁴⁾. Fundamentalmente existen dos tipos de adhesión celular: la adhesión entre dos células y la adhesión entre una célula y una matriz extracelular⁽¹²⁷⁾.

La interacción de neutrófilos circulantes con el endotelio vascular es un hecho esencial en la inducción de la respuesta inflamatoria aguda^(128,129). Aunque la adhesión y la migración de los neutrófilos ha sido ampliamente estudiada, el mecanismo por el cual estos reaccionan y se adhieren a la célula endotelial y posteriormente migran a través de la pared vascular no está aún suficientemente esclarecido. Un gran número de factores regulan la interacción entre los neutrófilos y las células endoteliales. Entre ellos destacan: a) la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de los neutrófilos activados y/o las células endoteliales, b) fuerzas hidrodinámicas que tienden a barrer los neutrófilos de la pared endotelial y c) la interacción de las cargas electrostáticas de los dos tipos celulares.

Otra situación fisiopatológica en la que se involucra a la interacción endotelio-neutrófilo son los procesos de isquemia-reperfusión^(130,131,132,133). En gran medida la disfunción microvascular asociada con la perfusión de tejidos isquémicos parece estar relacionada con la activación de neutrófilos adheridos al endotelio vascular. El papel de los neutrófilos en la isquemia-reperfusión se basa principalmente en la observación de que los neutrófilos se acumulan en los tejidos postisquémicos. Anticuerpos monoclonales contra moléculas de adhesión expresadas en la superficie del neutrófilo atenúan la disfunción microvascular por isquemia^(133,134). Sin embargo, y debido a que cada vez se implica más a los neutrófilos en el daño de la isquemia-reperfusión, es necesario clarificar con mayor exactitud los factores responsables de la activación de los mismos en esta situación fisiopatológica. Existen algunas pruebas que indican que moléculas oxidantes producidas por las células endoteliales desempeñan algún papel en este proceso⁽¹³⁵⁾. En este sentido, se ha demostrado que la infiltración de neutrófilos inducida por la perfusión se inhibe significativamente por el

pretratamiento con superóxido dismutasa o alopurinol, indicando que el ión superóxido derivado de la xantina oxidasa estaría implicado en la adhesión, quimiotaxis o activación de los neutrófilos asociada a la reperfusión⁽¹³²⁾. Diversos autores han demostrado que tanto el ión superóxido como el peróxido de hidrógeno pueden actuar como factores quimiotácticos para los neutrófilos. No está, de todas maneras dilucidado el papel de estas moléculas cuya liberación y producción se incrementa en la isquemia como por ejemplo la ET-1.

2.3.2.1.- Moléculas de Adhesión.

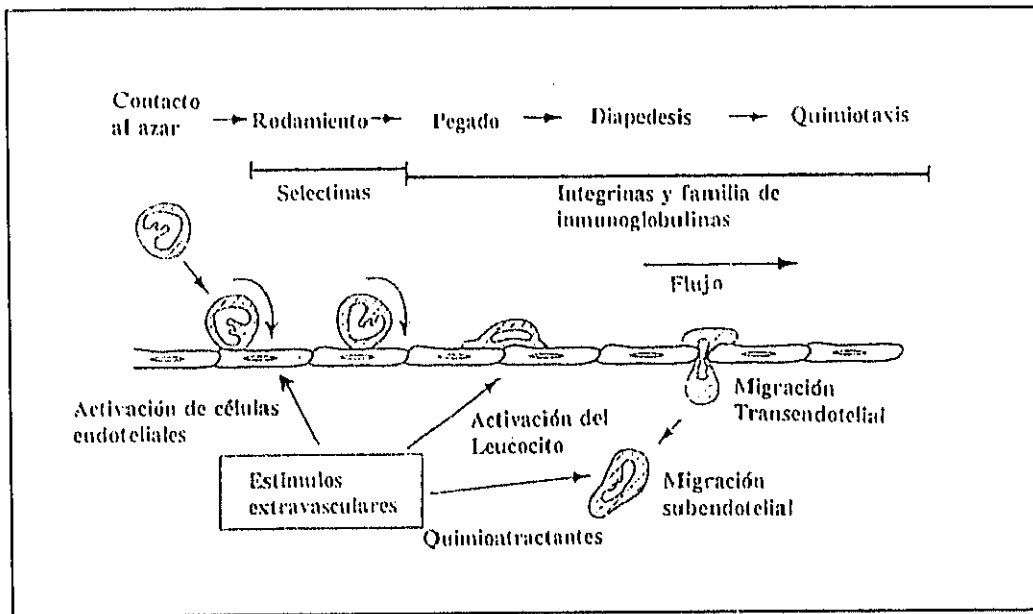
La adhesión de los neutrófilos a la célula endotelial es iniciada por estimuladores endoteliales que aumentan el calcio libre citoplasmático. Estos agentes actúan induciendo una rápida fusión (1-2 minutos) de los cuerpos de Weibel-Palade (orgánulos secretores endoteliales) con la membrana plasmática. La exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade produce una liberación del factor VIII von Willebrand, induciendo simultáneamente una traslocación a la superficie celular de una proteína, almacenada también en el orgánulo, llamada GMP-140^(136,137). Esta proteína fue descrita inicialmente en los orgánulos α de las plaquetas. En ausencia de neutrófilos, GMP-140 desaparece rápidamente de la superficie endotelial no siendo ya detectable 5-10 minutos después de la estimulación⁽¹³⁶⁾. Es probable, aunque no se ha demostrado, que la unión de los neutrófilos puede conservar a GMP-140 sobre la superficie endotelial.

Los neutrófilos, después de activados por factores quimiotácticos específicos como los leucotrienos⁽¹³⁸⁾, ionóforos, ésteres de forbol, PAF, factor de necrosis tumoral (TNF α)⁽¹³⁹⁾ y fMLP se adhieren rápidamente al endotelio vascular, a través de la expresión de moléculas de adhesión⁽¹⁴⁰⁾. Sin embargo, la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales, requiere la expresión de moléculas específicas en la superficie de ambas células, de forma que la activación de los neutrófilos y su interacción con el endotelio, no sólo depende de fenómenos localizados en el lado endotelial. Distintos autores han demostrado la importancia de una familia de moléculas de adhesión, localizadas sobre la superficie de los neutrófilos, las integrinas⁽¹⁴¹⁾. Estas moléculas son capaces de reconocer y unirse a ligandos en la superficie de las células endoteliales, en respuesta a estímulos específicos.

Las integrinas están implicadas en los procesos de adhesión celular y extravasación⁽¹²⁵⁾; también desempeñan un papel en la agregación plaquetaria, en funciones inmunológicas, en la reparación de tejidos, en la angiogénesis⁽¹²⁷⁾, en la invasión tumoral y en otras situaciones patológicas.

En el proceso de la adhesión celular se distinguen varias etapas (Figura 6).

Figura 6 .-
Proceso de adhesión y migración a través del endotelio de los neutrófilos.



La primera fase es la de rodamiento de los neutrófilos sobre la superficie endotelial. Esta etapa está mediada por la familia de las selectinas. Las selectinas incluyen un grupo de tres moléculas: a) L-selectina (Lam-1, LECAM-1) que se encuentra de forma constitutiva en los neutrófilos y cuando éstos se activan se expresan en la superficie celular, esto ocurre cuando comienza el proceso de rodamiento o frenado de los neutrófilos. b) P-selectina (GMP-140, PADGEM) se encuentra en plaquetas en los gránulos α y células endoteliales almacenada en los cuerpos de Weibel-Palade, que son rápidamente traslocados cuando se activa la superficie de las células endoteliales y las plaquetas con estímulos como histamina, trombina, bradiquinina, leucotrieno C_4 (LTC_4) o radicales libres, y actúa como receptores para monocitos y neutrófilos. c) E-selectina (ELAM-1) que solo se expresa en células endoteliales y es rápidamente sintetizada cuando son estimuladas con citoquinas ($TNF\alpha$, IL-1) o endotoxina.

El siguiente paso es la adhesión, que requiere la activación de los neutrófilos por un agente quimiotáctico y la expresión de las integrinas. Existen dos familias: las β_1 -integrinas; y las β_2 integrinas. En la familia de las β_1 integrinas se encuentra la VLA-4. Las β_2 integrinas estructuralmente se caracterizan por estar constituidas por una subunidad β común que ha sido denominada CD18, y por una subunidad α que las diferencia entre sí en tres grupos. Inicialmente fueron identificadas la CD11a/CD18, también denominada LFA-1^(125,141), y la CD11b/CD18, también denominada Mac-

^{1(125,126,142)}. La disponibilidad de anticuerpos monoclonales contra la fracción β común, permitió la identificación de un tercer miembro de esta familia, la CD11c/CD18, también denominada p150,95^(125,141).

La acción adhesiva de las β_2 integrinas es mediada principalmente por la CD11a/CD18 y por la CD11b/CD18⁽¹⁴³⁾. Anticuerpos monoclonales contra estas moléculas, son capaces de inhibir la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales, demostrando el importante papel de estas glicoproteínas.

La CD11a/CD18 está presente en forma constitutiva en la membrana celular de los neutrófilos. La CD11b/CD18 y la CD11c/CD18 están presentes en gránulos citoplasmáticos, que se localizan próximos a la membrana celular y que son translocados hacia la superficie del neutrófilo pocos minutos después de su activación. Para que el neutrófilo finalmente se una a la célula diana mediante la acción de las integrinas, parece necesaria una elevación de los niveles citoplasmáticos de calcio⁽¹⁴³⁾.

Los ligandos endoteliales de las integrinas β_2 , denominados moléculas de adhesión intercelular tipo 1 y 2 (ICAM1, ICAM2), son miembros de una familia de inmunoglobulinas localizadas en las células endoteliales⁽¹⁴⁵⁾. La CD11a/CD18 es capaz de reconocer ambos receptores y la CD11b/CD18 reconoce sólo al primero, desconociéndose hasta la fecha el ligando de unión al endotelio de la CD11c/CD18.

Tras la adhesión firme de los neutrófilos al endotelio, el siguiente paso es la migración trans-endotelial. Aunque factores quimiotácticos como LTB₄, C5a, y fMLP pueden aumentar la adhesión de neutrófilos al endotelio, la transmigración a través de la monocapa endotelial requiere un gradiente quimiotáctico⁽¹⁴⁵⁾. Estudios recientes han implicado a otra molécula de adhesión (PECAM-1) en la transmigración. PECAM-1 es un miembro de la familia de las inmunoglobulinas, se expresa en bajos niveles en la superficie de leucocitos y plaquetas, y en altos niveles en el endotelio⁽¹⁴⁶⁾. Existen trabajos que indican que anticuerpos que bloquean a PECAM-1 en la superficie de los leucocitos pueden regular la adhesión mediada por integrinas⁽¹⁴⁷⁾.

Tabla 6.- Moléculas de adhesión.

MOLECULAS	MIEMBROS	DISTRIBUCION	LIGANDO
SELECTINAS	P-selectina (PADGEM, GMP-140)	Endotelio. Plaquetas	PSGL-1, Sialyl Lewis ^x y otros
	E-selectina (ELAM-1)	Endotelio	Sialyl Lewis ^x y otros
	L-selectina (LAM-1, MEL-14)	Neutrófilos y linfocitos	E-selectin CD34, GlyCAM*
INTEGRINAS	VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$)	Monocitos, linfocitos y eosinófilos	VCAM-1, FN
	CD11a/CD18 β_2 (LFA-1)	Neutrófilos Linfocitos	ICAM-1, ICAM-2
	CD11b/CD18 β_2 (Mac-1, Mo1)	Neutrófilos Monocitos	ICAM-1, fibrinógeno.
	CD11c/CD18 β_2 (p150,95)	Neutrófilos Monocitos	No caracterizados
SUPERFAMILIA INMUNOGLOBULINAS	ICAM-1	Endotelio epitelio mesangio	CD11a/CD18 CD11b/CD18
	ICAM-2	Endotelio	CD11a/CD18
	VCAM-1	Endotelio	VLA-4
	PECAM-1	Endotelio Neutrófilos Plaquetas	PECAM, otros

2.4. FISIOPATOLOGIA

Papel de los neutrófilos en la isquemia miocárdica y reperfusión.

Se ha dado una importancia clave a los neutrófilos en los procesos de isquemia-reperfusión de órganos como el miocardio. En la isquemia-reperfusión miocárdica, los neutrófilos se activan y producen un efecto dañino en el miocardio, mediante la liberación de radicales libres de oxígeno altamente citotóxicos, enzimas proteolíticas, productos derivados de lipoxigenasa y citoquinas que modifican la función del endotelio y de las plaquetas^(148,149). Los agregados de neutrófilos juegan un papel importante en la formación de tapones en los capilares, creando el fenómeno de no-reflujo, que bloquea la circulación capilar. Las plaquetas y el endotelio también pueden modificar a su vez la función de los neutrófilos⁽⁶⁵⁾. El neutrófilo regula la función endotelial mediante la expresión de moléculas de adhesión y mediante la liberación de factores solubles tales como el óxido nítrico,

prostaciclina, endotelinas, PAF e interleuquina-8. Las plaquetas afectan a la activación de los neutrófilos mediante la liberación de tromboxano A_2 , Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), serotonina, productos de la lipoxigenasa, proteasas y adenosina⁽¹⁵⁰⁾.

La modificación de las interacciones entre neutrófilos, plaquetas y endotelio utilizando dadores de NO, bloqueantes de tromboxano A_2 , análogos de prostaglandinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o bloqueantes de endotelina, puede ser una intervención terapéutica muy beneficiosa. Actualmente también se estudia la posibilidad de reducir el daño producido por los neutrófilos en el miocardio mediante "scavengers" o secuestrantes de radicales libres de oxígeno, anticuerpos contra las moléculas de adhesión o antagonistas de las citoquinas, araquidonatos o lípidos, incluido el PAF.

Papel de los neutrófilos en el daño tisular.

El daño producido por los neutrófilos en los tejidos inflamados puede ser causado por varios mecanismos: 1) La activación de la adhesión de los neutrófilos depende de integrinas no solo promueve la adhesión al endotelio sino también la agregación de los neutrófilos entre sí (mediada por CD11b/CD18), lo que puede resultar en un taponamiento en los microvasos y una isquemia distal⁽¹⁵¹⁾. 2) una elevada concentración de estímulos inflamatorios causa la degranulación de los neutrófilos con la liberación de varias proteasas. Dos enzimas muy implicadas en el daño a la pared arterial son la colagenasa y la elastasa. En los tejidos y en el suero existen antiproteasas que pueden en parte inhibir algunas de las proteasas liberadas por los neutrófilos. 3) la generación de metabolitos de oxígeno dependientes de la NADPH-oxidasa activada por endotoxinas, citoquinas inflamatorias etc, pueden producir un daño en la célula endotelial y promover los efectos destructivos de las proteasas ya sea por activar metaloproteinasas latentes o por desactivar antiproteinasas sensibles a oxidantes⁽¹⁵²⁾.

2.5. OXIDO NITRICO (NO) EN EL NEUTROFILO

La primera evidencia de que los neutrófilos producían una sustancia con capacidad vasorrelajante fueron los trabajos de Rimele y cols⁽¹⁵³⁾ en los que se demostró cómo leucocitos peritoneales de rata liberaban una sustancia capaz de relajar segmentos de aorta desendotelizados e incrementar los niveles de GMPc en estos tejidos⁽¹⁵⁴⁾. Harrison y cols⁽¹⁵⁵⁾ demostraron cómo los neutrófilos humanos

inhibían la agregación plaquetaria. La producción de esta sustancia antiagregante era inhibible por L-NMMA⁽¹⁵⁶⁾. Este "factor relajante derivado de los neutrófilos" tiene un perfil farmacológico idéntico al EDRF. La síntesis del NO por el neutrófilo se produce mediante los dos tipos de óxido nítrico sintasa (NOS), inducible ó independiente de calcio^(80,157), y constitutiva ó dependiente de calcio⁽⁷⁹⁾. La L-Canavanina, que inhibe la formación de NO en el macrófago, pero no en las células endoteliales, también inhibe la liberación de NO por el neutrófilo^(156,158). Sin embargo, el Nw L-arginina metil ester (L-NAME), que es un potente inhibidor de la síntesis endotelial de NO⁽¹⁵⁹⁾ no afecta a la síntesis de NO del neutrófilo^(160,161). La síntesis de NO en los neutrófilos se estimula por agentes quimiotácticos como el fMLP o LTB₄⁽¹⁵⁶⁾.

El significado biológico y fisiológico de la producción de NO por el neutrófilo no ha sido todavía determinado. Se sabe que la degradación del NO es acelerada por especies reactivas derivadas del oxígeno y en particular por el ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)^(162,163). Distintos autores han descrito la correlación existente entre un aumento en la síntesis de NO con la de $O_2^{\cdot-}$ por el neutrófilo⁽¹⁶⁰⁾. Esto reflejaría un mecanismo de control de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en situaciones tales como la migración o la fagocitosis, pudiendo el NO actuar como citoprotector contra el daño potencial que ejercería el $O_2^{\cdot-}$ contra el propio neutrófilo. Otra función en la que se ha implicado al NO de origen neutrofilico, es en la regulación de la agregación plaquetaria. Grupos como el de Vane⁽¹⁶⁴⁾ han descrito como la agregación de plaquetas activadas con trombina es menor en presencia de neutrófilos; además, recientemente, López-Farré y cols⁽¹⁶⁵⁾ han demostrado cómo en presencia de aspirina, los neutrófilos generan NO, por lo que éste sería el responsable del papel inhibitorio de los neutrófilos en la agregación plaquetaria en presencia de aspirina. Esto le daría al neutrófilo un papel relevante como controlador de la propagación del trombo, pudiendo tener por lo tanto una función moduladora en el proceso de la hemostasia y trombosis. Se ha descrito que agentes dadores de NO como la molsidomina inhiben la liberación de enzimas lisosomales⁽¹⁶⁶⁾, mientras que la inhibición de la NOS por L-NMMA inhibe la quimiotaxis en los neutrófilos⁽¹⁶⁷⁾.

2.6 NUCLEOTIDOS CICLICOS. GMPc EN EL NEUTROFILO.

Cuando los neutrófilos se exponen a partículas fagocitables se ha observado un aumento de los niveles de AMPc temprano (máximo a los 15 segundos) y breve (retorna a los niveles basales al minuto o a los 2 minutos). Durante este mismo intervalo no se observan cambios en los niveles de GMPc. Los niveles de AMPc correlacionan muy bien con la quimiotaxis y la degranulación,

sin embargo hay pruebas que sugieren que los cambios en los niveles de AMPc no son necesarios ni suficientes para las respuestas de los neutrófilos. La relación entre los receptores de los agentes quimioattractantes y la adenilato ciclasa es indirecta y parece estar mediada por calcio u otros intermediarios en la vía del inositol. Los neutrófilos estimulados liberan adenosina que se puede unir a los receptores de purinas los cuales amplifican la señal de la adenilato ciclasa aumentando los niveles de AMPc.

Los neutrófilos disponen de guanilato ciclasa soluble⁽⁹⁰⁾, aunque no se ha establecido qué papel ejerce el GMPc producido por esta guanilato ciclasa sobre el propio neutrófilo⁽¹⁶⁷⁾.

Distintos estudios demuestran que el análogo permeable del GMPc, 8-Br-GMPc, y otros análogos del GMPc promueven quimiotaxis y degranulación en neutrófilos activados^(167,168). El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en el neutrófilo induce un aumento en la producción de NO y GMPc. Este aumento en el GMPc en neutrófilos activados coincide con la fosforilación dependiente de GMPc de un filamento del citoesqueleto, la vimentina⁽¹⁶⁸⁾. El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ parece ser necesario para la colocalización de la quinasa dependiente de GMPc y la vimentina en la célula, con lo que la quinasa cataliza la reacción de fosforilación de la vimentina y se produce la polarización de la célula y su degranulación, por lo que se sugiere un papel de la quinasa dependiente de GMPc en todos estos hechos.

2.7. ENDOTELINA-1 (ET-1) Y CELULAS DE LA SANGRE.

A pesar del gran número de trabajos existentes en la literatura sobre el mecanismo de acción y las implicaciones fisiopatológicas de la ET-1 como vasoconstrictor, poco se sabe sobre la importancia de la ET-1 sobre otras células relacionadas con el endotelio, como son las células de la sangre.

En relación con las plaquetas se conoce que la ET-1 puede actuar en combinación con PGI_2 y NO para regular la interacción de las plaquetas con la pared vascular y así, limitar la formación del trombo. Sin embargo, el efecto de la ET-1 sobre la agregación plaquetaria no parece que sea sobre la misma plaqueta, ya que existen datos en la literatura en los que se demuestra que la ET-1 no afecta a la agregación de las plaquetas *in vitro*⁽¹⁶⁹⁾. No obstante, la ET-1 administrada *in vivo*, puede disminuir la agregación plaquetaria mediante la liberación de NO y PGI_2 ⁽¹⁷⁰⁾. Hay un dato interesante que destacar ya que las plaquetas son capaces de estimular la expresión del ARNm de la ET-1 en células endoteliales en cultivo⁽¹⁷¹⁾. Béa y cols demostraron que concentraciones crecientes de plaquetas agregadas estimulan la producción de ET-1 en células endoteliales en cultivo. Sin embargo,

las plaquetas agregadas no estimulan o incluso inhiben la producción de endotelina en los vasos intactos. Este efecto no está relacionado con efectos inhibitorios de el NO o la prostaciclina, y puede estar causado por la liberación de algún factor derivado del músculo liso que inhiba la liberación de endotelina tanto en condiciones basales como después de la estimulación con plaquetas agregadas⁽¹⁷²⁾. Finalmente, la trombina es también un potente activador de la síntesis y liberación de ET-1; por lo que la ET-1 puede contribuir a la curación de los vasos dañados, y participar en los procesos de coagulación sanguínea⁽¹⁷³⁾.

A la ET-1 se le asigna un importante papel en la génesis y desarrollo de distintas patologías que incluyen daño vascular, como la arteriosclerosis. El papel de la ET-1 en la aterogénesis está principalmente relacionado con su potente acción quimiotáctica sobre los monocitos⁽¹⁷⁶⁾ y fibroblastos⁽¹⁷⁵⁾, lo que contribuye a la formación de la placa. Por el contrario, la propiedad quimioattractante de la ET-1 sugiere un posible papel de ésta en los procesos de curación de heridas. Sobre el efecto de la ET-1 en la quimiotaxis de los monocitos y macrófagos, existen resultados controvertidos^(174,176), ya que Bath y cols han sugerido que ni la ET-1 ni el PDGF tienen efecto sobre la quimiotaxis o la adhesión de los monocitos al endotelio. También existen datos sobre el efecto de la ET-1 en el aumento de calcio intracelular, fosforilación de proteínas⁽¹⁷⁷⁾, producción de radicales superóxido e interleuquinas^(177,178) o la presencia de receptores de ET-1 en los monocitos y macrófagos^(27,179). Las células humanas circulantes de la sangre, como plaquetas, linfocitos o neutrófilos no generan ET-1, con la excepción de los macrófagos⁽¹⁸⁰⁾. La secreción de ET-1 y ET-3 por los macrófagos humanos se estimula por LPS, lo que sugiere un papel de las ETs en los procesos inflamatorios en los que están presentes los macrófagos tisulares. En estudios recientes se ha observado que la ET-4, que originalmente se encuentra en la mucosa intestinal, es también un potente agonista en la producción de citoquinas y prostanoídes por los monocitos⁽¹⁸¹⁾.

El descubrimiento de que el neutrófilo tiene la maquinaria enzimática necesaria para producir ET-1 a partir de su precursor proteico⁽⁷⁾ abre un abanico de preguntas por la coexistencia en dos células estrechamente relacionadas, el endotelio y el neutrófilo, de dos sistemas con propiedades teóricamente opuestas, el NO y la ET-1. Estos dos sistemas podrían interactuar en una forma no estudiada hasta la fecha. Los neutrófilos humanos inducen la expresión del gen de la ET-1 en las células endoteliales, estimulando la liberación de ET-1, y para que se produzca este efecto se requiere el contacto directo célula endotelial-neutrófilo. Diferentes proteasas liberadas por los neutrófilos son capaces de convertir la ET grande en su metabolito activo, la ET-1⁽¹⁸²⁾. Además, las proteasas liberadas por los neutrófilos son capaces de degradar e inactivar la ET-1⁽¹⁸³⁾. También se conoce

un papel de la ET-1 en la producción de anión superóxido en los neutrófilos estimulados con fMLP⁽¹⁸⁴⁾; pero no se conocen datos sobre el posible efecto directo de la ET-1 en la activación de los neutrófilos, su mecanismo de acción y como consecuencia su papel en distintas patologías como el infarto agudo de miocardio, la uremia o el fallo renal agudo. Del estudio de la interacción de todos estos factores puede emerger una definición del verdadero papel de la ET-1 en relación a los neutrófilos y el daño tisular. Estos datos pueden, además, contribuir a una mejor comprensión de cuál es el significado de la ET-1 como mediador biológico a nivel tisular.

II. Hipótesis y Objetivos

HIPOTESIS

La hipótesis general de esta tesis fue que la endotelina-1 y el sistema NO/GMPc tienen un papel significativo en los mecanismos de activación y desactivación de neutrófilos, y en la relación de estos con el endotelio vascular.

OBJETIVOS

1. Analizar si la endotelina-1 activa los neutrófilos. Para ello se eligieron como parámetros de activación celular: a) Cambios en el calcio libre citosólico; b) liberación de β -Glucuronidasa; c) polimerización de filamentos de F-actina; d) producción de radicales libres del tipo del anión superóxido.
2. Estudiar la relación del sistema NO/GMPc con la ET-1 en la regulación de la activación de los neutrófilos.
3. Analizar qué papel tiene la activación de los neutrófilos por la ET-1 en la interacción de estas células con el endotelio vascular. Dentro de este mismo objetivo, planteamos identificar las proteínas de adhesión del neutrófilo involucradas en la interacción.
4. Por último, analizamos la implicación de la estimulación de los neutrófilos por la ET-1 sobre la acumulación de éstos a el corazón aislado perfundido y en un modelo de animal entero.

III. Materiales y Métodos

1.- ESTUDIOS IN VITRO

1.1.- ESTUDIOS EN NEUTROFILOS

1.1.1.- Aislamiento de neutrófilos

Los neutrófilos humanos se obtuvieron de sangre periférica de donantes voluntarios sanos. La sangre fue recogida en tubos Falcon que contenían EDTA 0.2 M y sedimentada por dextrano 6% (p/v), centrifugando el sobrenadante a 2500 rpm durante 15 min. El precipitado se resuspendió en tampón Hepes, (131 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 5 mM glucosa y 20 mM Hepes, pH 7.4), seguido de centrifugación a 1800 rpm durante 30 min en gradiente de Ficoll-Hypaque (Flow Lab., Irvine). El remanente eritrocitario se eliminó mediante lisis hipotónica.

Los neutrófilos aislados se resuspendieron en tampón Hepes y se procedió a su conteo mediante colorante de basófilos. En algunos experimentos adicionales, se utilizaron también neutrófilos de conejo aislados de la misma manera. La pureza de los neutrófilos aislados fue mayor del 95% con una viabilidad del 98% medida mediante la exclusión de azul tripan.

- Criterios de viabilidad celular

Para conocer el porcentaje de viabilidad obtenida tras el aislamiento de los neutrófilos y después de realizarse la incubación de las células con las distintas sustancias en estudio, se realizaron experimentos de exclusión de azul tripan. Para ello, tras el periodo de incubación con los distintos agentes utilizados, se retiró el sobrenadante añadiéndose 1 ml de una disolución de azul tripan al 50%. Los neutrófilos se incubaron 1 minuto con esta solución y tras lavado se procedió a la observación microscópica de las células. El porcentaje de viabilidad se calculó mediante la cuantificación de las células teñidas de azul (células muertas) en relación al número total de células en, al menos, tres campos microscópicos diferentes. Las células viables, más del 98%, eran capaces de excluir el colorante por lo que no aparecieron teñidas. Por el contrario, las células muertas o en periodo de degeneración, al haber perdido la capacidad funcional de su membrana citoplasmática, presentaban una coloración azul.

El conteo de la viabilidad de las células endoteliales se realizó de una forma similar.

1.1.2.- Medida de los niveles de calcio libre citosólicos ($[Ca^{2+}]_i$) mediante fura-2.

Los neutrófilos se cargaron incubando la suspensión celular con 2 μ M fura-2/AM durante 60 min a 37° C en tampón Hepes. La suspensión celular se lavó dos veces, mediante centrifugación a baja velocidad, y se resuspendió en tampón Hepes en una densidad de 5.10⁶ células/ml. Una alícuota de 200 μ l de la suspensión se incubó con 800 μ l de tampón PSS-Ca²⁺ (140 mM NaCl; 4.6 mM KCl; 2.0 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10.0 mM Glucosa y 10 mM Hepes, pH 7.4) durante 30 min a 37° C. En muestras similares, los neutrófilos se preincubaron durante 5 min en presencia de TMB-8 10⁻⁵M, un inhibidor de la liberación de calcio desde los orgánulos subcelulares⁽¹⁸⁵⁾. Se realizaron experimentos adicionales en un medio libre de calcio que contenía EGTA 2 mM. El tiempo de preincubación con el medio libre de calcio/EGTA fue aproximadamente 30 s. La medida de la $[Ca^{2+}]_i$ se realizó con un espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS 50) en cubeta de cuarzo con agitación y a 37° C. Antes del experimento, se realizó un barrido de la fluorescencia del fura-2/AM hidrolizado. Las longitudes óptimas de excitación y emisión fueron 340, 380 y 500 nm respectivamente. La $[Ca^{2+}]_i$ se calculó mediante una ecuación estándar, empleando una constante de disociación (Kd) del fura-2 de 224 nM a 37° C⁽¹⁸⁶⁾. La Rmax y Rmin se determinaron individualmente para cada experimento añadiendo Tritón X-100 (0.1%) y EGTA (10 mM) respectivamente. Se realizaron experimentos adicionales sobre neutrófilos adheridos a discos de cristal, para eliminar posibles interferencias por efectos agregantes de los diferentes mediadores sobre los neutrófilos.

1.1.3.- Medida de liberación de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).

La liberación de $O_2^{\cdot-}$ se midió mediante su capacidad de reducir el ferricitocromo C⁽¹⁸⁷⁾. Los neutrófilos aislados, se resuspendieron en tampón Krebs-Henseleit⁽¹⁸⁸⁾ (118,0 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25,0 mM NaHCO₃, 2,5 mM Cl₂Ca, 5,0 mM Glucosa; pH:7.4) en una concentración de 5.10⁶ células/ml en presencia de ferricitocromo C 2.25 M, incubándolos a 37° C durante 30 min en presencia o ausencia de ET-1 (10⁻⁷M), fMLP (10⁻⁷M) o del éster de forbol, PMA (10⁻⁶M). La reacción se paró mediante centrifugación a 1000 rpm, 10 min, a 4°C. El $O_2^{\cdot-}$ liberado por los neutrófilos se midió a 550 nm.

1.1.4.- Medida de Liberación de β -glucuronidasa

Medimos la liberación de β -glucuronidasa como medida de liberación de enzimas lisosomales de los neutrófilos en respuesta a ET-1. Se midió utilizando ácido fenolftalein- β -glucurónico como sustrato, el cual es hidrolizado por la β -glucuronidasa presente en la muestra dando lugar a fenolftaleína, que se detecta mediante la medida de absorbancia a 540 nm⁽¹⁸⁹⁾.

Las células (5×10^6 neutrófilos/ml) se estimularon con distintas concentraciones de ET-1 y 5 μ g/ml de citocalasina B en tampón PSS- Ca^{2+} . Una vez parada la reacción (4°C y por centrifugación a 12000 rpm, 5' a 4°C) se midió la β -glucuronidasa en el sobrenadante.

La reacción se llevó a cabo en un medio con 250 μ l de acetato sódico 0.1 M pH= 4.5; 200 μ l de la muestra a medir (en este caso sobrenadante de neutrófilos) y 50 μ l de una solución 10 mM de ácido fenolftalein β -glucurónico. Se agitó toda la mezcla. La reacción se incubó 4 horas a 37°C con agitación en ausencia de luz, y se detuvo por la adición de 500 μ l de TCA 5%, 1.25 ml de una solución alcalina de Glicina (Glicina 0,217 M, NaCl 0.217 M, NaOH 12 ml 100% w/l, pH:10.7) y 750 μ l de H_2O . Tras una breve agitación se leyó la absorbancia de la mezcla resultante a 540 nm en un espectrofotómetro U-2000 de Hitachi.

1.1.5.- Polimerización de filamentos de F-actina

Se realizaron experimentos para estudiar la polimerización del filamento F-actina en neutrófilos estimulados con el agente quimiotáctico fMLP o con ET-1. Para ello los neutrófilos aislados ($2 \times 10^6/500 \mu$ l) se incubaron en tampón Krebs-Henseleit con 0.01 % de albúmina bovina, durante 30 min y se estimularon con fMLP 10^{-7}M ó ET-1 10^{-7}M durante 45 segundos, tiempo óptimo de polimerización de actina inducida por fMLP⁽¹⁹⁰⁾.

Tras esta incubación los neutrófilos se fijaron con glutaraldehído al 1% (concentración final), durante 15 minutos a 37°C . Posteriormente se incubaron con lisofosfatidilcolina 100 μ g/ml y con NBD-Falacidina (Molecular Probes, Eugene, OR) $3.3 \times 10^{-7}\text{M}$, 15 min 25°C , se centrifugaron a 16000 g, 1 min. Se recuperó el precipitado y se extrajo en 1 ml metanol, durante 1 hora con agitación y en la oscuridad, se centrifugaron otra vez a 16000 g 1 min y se recuperó el sobrenadante (metanol), en el cual se mide la intensidad de fluorescencia relativa en un espectrofluorímetro LS-50 Perkin Elmer (excitación a 465 nm; emisión a 530 nm), en cubeta de cuarzo. Los resultados se expresaron como incremento en la intensidad de fluorescencia relativa

respecto al control.

1.1.6.- Incubaciones con L-arginina y antagonistas de la formación de NO.

Se efectuaron experimentos preincubando los neutrófilos durante 60 min a 37° C con: a) el aminoácido dador de NO, L-arginina 10⁻⁴M; b) con dos análogos de L-arginina que actúan como antagonistas específicos y competitivos de la formación de NO, N^W-Nitro-L-arginina (NwNLA) 10⁻⁴M y N^G- monometil-L-arginina (L-NMMA) 10⁻⁴M^(65,191) y c) con el isómero no activo de la L-arginina, D-arginina 10⁻⁴M.

En algunos casos, se realizaron experimentos de reversión del efecto de la L-arginina mediante la coincubación de los neutrófilos con L-arginina 10⁻⁴M junto con L-NMMA 5x10⁻⁴M o NwNLA 5x10⁻⁴M durante 60 min a 37°C.

1.1.7.- Marcaje de neutrófilos con [³H]-L-arginina

Los neutrófilos se incubaron en presencia de 1 μCi de [³H]-L-arginina y 10⁻⁴ M de L-arginina en tampón Hepes durante 60 minutos a 37°C. Al cabo de los 60 minutos, la radioactividad no incorporada se eliminó lavando 3 veces las células con tampón Hepes (1000 rpm, 5 min). Finalmente los neutrófilos se resuspendieron en tampón PSS-Ca²⁺.

1.1.8.- Determinación del contenido de [³H]-L-citrulina

Se realizaron experimentos en paralelo a los de la captación de L-arginina, de medida de generación de NO mediante la transformación de [³H]-L-arginina en [³H]-L-citrulina. Una vez lisados los neutrófilos con metanol (5x10⁶/ml) y tomada una alícuota para cuantificar la captación de este aminoácido por los neutrófilos mediante contaje en contador beta (como se detallará posteriormente), el sobrenadante restante se secó bajo atmósfera de N₂ a 37°C. El extracto seco se resuspendió en 20 mM Hepes/KOH pH 5.5, y se aplicó sobre una columna DOWEX AG50x8 (forma-Na⁺), eluyéndose con H₂O (fracción en la que aparece la L-citrulina) y con NaOH 0,5 N (fracción en la que aparece la L-arginina). Las fracciones [³H]-L-arginina y [³H]-L-citrulina se cuantificaron mediante centelleo líquido.

1.1.9.- Medida del GMPc

La concentración de GMPc en los neutrófilos se midió mediante un radioinmunoensayo comercial acetilado (Amersham). La suspensión de neutrófilos (5×10^6 células/ml) se preincubó en 1 ml de tampón Krebs-Henseleit que contenía el inhibidor de la fosfodiesterasa, enzima responsable de la degradación del GMPc, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) $2 \mu\text{M}$, a 37°C durante 1 min. En algunos casos, los neutrófilos se preincubaron durante 1 hora con L-arginina 10^{-4}M . A continuación se añadió ET-1 10^{-7}M , fMLP 10^{-7}M o tampón continuándose la incubación durante 2 min. La reacción se paró añadiéndose ácido tricloroacético frío (10% peso/volumen), almacenándose las muestras a -20°C hasta su extracción.

El GMPc formado se extrajo mediante tres lavados sucesivos con 4 volúmenes de éter etílico y posterior evaporación bajo atmósfera de N_2 a 60°C , guardándose las muestras inmediatamente a -70°C hasta el día en que se cuantificó mediante el kit comercial. Todas las muestras se procesaron antes de 30 días de conservación y fueron descongeladas una sola vez, inmediatamente antes de la medida. Muestras con cantidades conocidas de GMPc se sometieron al mismo proceso, demostrándose que el conjunto de procedimientos no causó deterioro del GMPc, siendo la recuperación superior al 80%.

1.1.10.- Medida de la captación de [^3H]-L-arginina.

La captación de [^3H]-L-arginina se realizó en neutrófilos aislados y adheridos sobre placas Petri durante 3 horas en una densidad de 10^7 células/ml. Las células adheridas se lavaron 3 veces con tampón PSS- Ca^{2+} y se incubaron en presencia de $1 \mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]-L-arginina y 10^{-4}M de L-arginina en PSS- Ca^{2+} durante tiempos variables a 37°C . La reacción se paró mediante aspiración y rápido lavado del medio de incubación con PSS- Ca^{2+} . Las células fueron extraídas con 1 ml de metanol frío durante 30 min, y tras centrifugación rápida (3000 g, 3 min) una alícuota del sobrenadante se analizó en un contador beta (Beckman) por centelleo líquido. Se realizaron experimentos similares para determinar la V_{max} y la K_m mediante la utilización de distintas concentraciones de L-arginina fría. Como posibles activadores de la captación de L-arginina por el neutrófilo se utilizó un factor quimiotáctico para los neutrófilos, fMLP 10^{-7}M o ET-1 10^{-7}M .

Con el fin de estudiar el posible papel de un transportador Na^+ -dependiente, se hicieron experimentos sustituyendo al CINA por cloruro de colina en proporciones equimolares, con el fin

de no interferir con la osmolaridad del tampón debida a la ausencia de la concentración fisiológica de ClNa (140 mM) en el medio extracelular.

1.1.11.- Marcaje de neutrófilos con ^{51}Cr

Los neutrófilos aislados se marcaron con ^{51}Cr (New England Nuclear) para la posterior realización de los experimentos de adhesión al endotelio. Los neutrófilos se incubaron con $2 \mu\text{Ci}/10^6$ células de $\text{Na}_2[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$ durante 60 minutos a 37°C . Transcurrido el periodo de incubación, las células se lavaron 3 veces con tampón Hepes, resuspendiéndose finalmente en tampón Krebs-Henseleit con 0.2% albúmina sérica bovina (BSA) a una densidad de $2.5 \cdot 10^6$ células/500 μl .

1.2.- ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron cultivos en monocapa de células de endotelio vascular bovino, cultivos de células endoteliales humanas obtenidas de la vena de cordones umbilicales y neutrófilos humanos. En este estudio se analizó: a) El efecto de la ET-1 sobre la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales en cultivo, b) Los mecanismos de adhesión, en particular las proteínas de adhesión implicadas.

1.2.1.- Obtención y cultivo células endoteliales de aorta bovina.

Las células endoteliales se aislaron de aorta de bovino según el método de Jaffe y cols⁽¹⁹²⁾. La aorta se cortó en segmentos de 20 cm de longitud, limpiándola de tejido conectivo y ligando las arterias intercostales. La superficie de la luz del vaso se lavó con tampón PBS (2,6 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 8 mM NaH_2PO_4 , 5.5 mM Glucosa; pH 7.4), que contenía penicilina/estreptomicina (1000 UI/ml), con el fin de eliminar las células de la sangre adheridas. Posteriormente se cerró un extremo del segmento arterial, mediante clampaje, rellenándose el vaso con una solución que contenía colagenasa Tipo II (Sigma) en concentración 0,5 mg/ml. Tras cerrar el extremo opuesto, la arteria se incubó a 37°C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, la solución de colagenasa se lavó con RPMI 1640 que contenía suero de ternera fetal 10%. La suspensión celular se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos, sembrándose el precipitado

celular en frascos de cultivo.

Las células endoteliales humanas se aislaron de la vena de cordones umbilicales mediante tratamiento con 0,5 mg/ml de colagenasa tipo II (Sigma) incubadas a 37°C durante 30 min. Estas células se cultivaron en pocillos cubiertos de una matriz de gelatina (0.2%). El medio de cultivo utilizado fue RPMI con 20% de suero de ternera fetal y con 10 µg/ml de factor de crecimiento endotelial.

Las células en cultivo se mantuvieron en una incubadora humificada a 37°C y con 95% O₂ y 5% CO₂, cambiándose el medio de cultivo cada dos días. La identificación de las células se realizó microscópicamente mediante su apariencia pavimentosa (Figura 7) y bioquímicamente mediante la detección de Factor VIII. Para los distintos experimentos, las células endoteliales se utilizaron entre el 1º y 3º pasaje (realizados mediante tripsinización de las células obtenidas en el cultivo primario, con tripsina/EDTA) y en estado de confluencia completa en monocapa. Los experimentos se realizaron en células crecidas en cajas de 24 pocillos o en cajas Petri individualizadas.

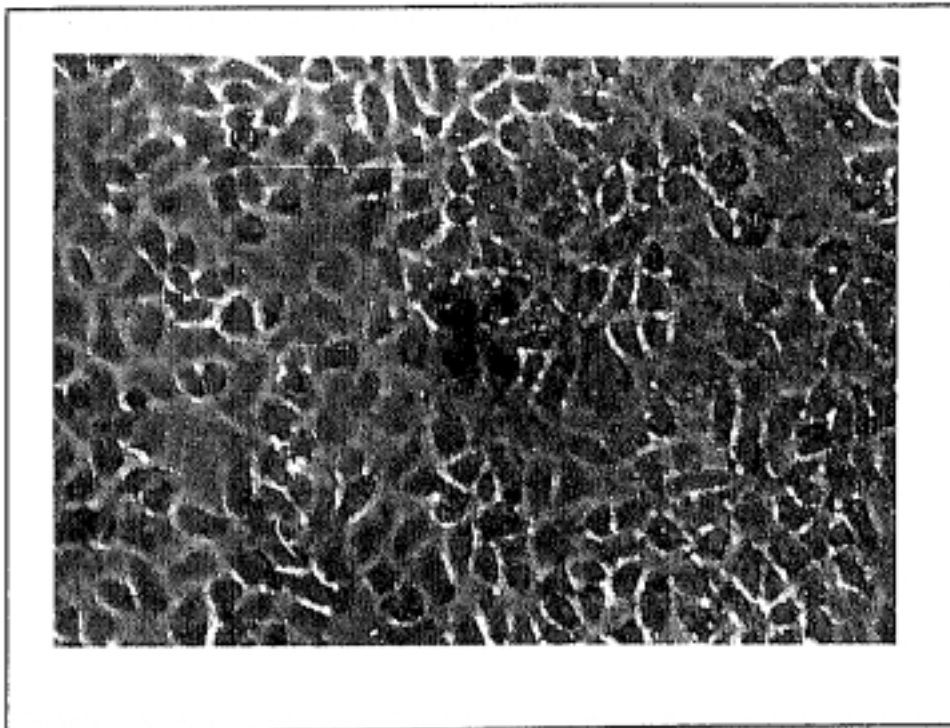


Figura 7.- *Fotografía de un cultivo primario de células endoteliales bovinas en confluencia.*

1.2.2.- Adhesión de neutrófilos a células endoteliales en cultivo.

Las células endoteliales confluentes, se lavaron dos veces con tampón Krebs-Henseleit con 0.2% BSA pH 7.4, preincubándolas con 500 μ l de este mismo tampón durante 2 min. Posteriormente se añadieron los neutrófilos marcados con ^{51}Cr (2.5×10^6 células/500 μ l de Krebs-Henseleit), en presencia o ausencia de los distintos agonistas (ET-1 10^{-7}M , el péptido quimiotáctico fMLP 10^{-7}M , el ester de forbol PMA 10^{-6}M). Los dos tipos celulares se coincubaron durante 30 min a 37°C , junto con los distintos agonistas. Los neutrófilos no adheridos al endotelio se lavaron mediante aspiración del sobrenadante y lavado por dos veces con tampón Krebs-Henseleit. Las células endoteliales junto con los neutrófilos adheridos se lisaron con 500 μ l de NaOH 5M. El número de neutrófilos adheridos se midió utilizando un contador gamma. Los resultados se expresaron como número de neutrófilos adheridos por pocillo de células endoteliales. Cada pocillo contenía una media de $3,5 \times 10^3$ células endoteliales, correspondiente a una media de $80 \pm 10 \mu\text{g}$ de proteína.

Con el fin de individualizar la importancia relativa de los neutrófilos o de la célula endotelial en la adhesión mediada por ET-1, se realizaron experimentos de adhesión sobre una superficie plástica (Tissue culture dish 35x10 mm, Costar, Cambridge, MS, USA). Para analizar la especificidad del efecto de la ET-1, se llevaron a cabo experimentos similares de adhesión en presencia de otras hormonas vasoconstrictoras como vasopresina 10^{-7}M o angiotensina II 10^{-7}M .

1.2.3.- Medida de expresión de integrinas en el neutrófilo. Citometría de flujo.

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron: a) TS1/18 que reconoce el antígeno común de la subunidad común β de las integrinas, CD18 (anti-CD18); b) TP1/32 y TS1/11, que reconocen la cadena CD11a (anti-LFA-1); c) Bear-1 que reconoce la cadena CD11b (anti-Mac-1); d) HC1/1 que reconoce la cadena CD11c (anti-p150,95). Como anticuerpo no específico que sirvió de control negativo se utilizó el P3X63 (IgG₁) obtenido del sobrenadante de cultivo de células de mieloma. Todos los anticuerpos fueron monoclonales de rata.

Para los experimentos de citometría de flujo, los neutrófilos fueron incubados con 10 μ l de los diferentes anticuerpos monoclonales (1×10^6 células/ml, 30 min, 4°C). Los neutrófilos se lavaron 3 veces, para eliminar el anticuerpo no ligado, y se resuspendieron en 500 μ l de solución de Krebs. Posteriormente se incubaron otra vez con 5 μ l de una dilución 1:40 de anticuerpo de

carnero antiratón IgG marcado con isocianato de fluoresceína (The binding site, Birmingham, England), durante 30 min adicionales, a 4°C. Después de lavar, las células fueron suspendidas en 200 µl de paraformaldehído al 1% en tampón Hepes y guardadas a 4°C. Se realizaron controles con células incubadas con el anticuerpo secundario solo o con un anticuerpo inespecífico. Los análisis de citometría de flujo midieron la fluorescencia utilizando un citómetro de flujo/clasificador EPICS (Coulter), con excitación a 480 nm y emisión a 520 nm. En cada muestra se analizó un mínimo de 6000 células. Los datos se obtuvieron como histogramas de un solo parámetro, graficando el logaritmo de la fluorescencia verde contra el número de células.

2.- ESTUDIOS IN VIVO

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Para los estudios "in vivo" y con órganos perfundidos se utilizaron conejos New Zealand, macho con peso aproximado de 2,5-3 Kg procedentes del animalario de la Fundación Jiménez Díaz. Estos animales fueron alimentados con dieta estandar y agua "ad libitum".

2.1.- ESTUDIOS EN CORAZON AISLADO.

2.1.1.- Sistema de perfusión

El procedimiento se realizó mediante una modificación del diseñado por Maack y cols⁽¹⁹³⁾.

Los órganos se mantuvieron perfundidos mediante inmersión dentro de un baño siliconizado, oxigenado (O₂ 95%, CO₂ 5%) y termostatizado (37°C) conteniendo solución de Krebs-Henseleit suplementada con 5 mM de glucosa y 5% de BSA libre de ácidos grasos.

El flujo hacia el órgano se realizó a través de una bomba de perfusión (Travenol) y la presión de perfusión permaneció constante entre 90-110 mmHg durante todo el experimento, controlados mediante polígrafo (Letica 2006).

Durante todo el experimento el baño y oxigenador se mantuvieron termostatizados, mediante flujo continuo de agua a 37°C en su doble pared, desde un baño térmico (Selecta-Pacisa) y controlada con termómetro (Frowi-FW21). El baño y el oxigenador de cristal fueron siliconizados previamente a su utilización. Antes de iniciar el experimento, todos los circuitos

fueron rellenos con el líquido de perfusión, que se mantuvo gaseado durante todo el periodo experimental. El circuito de perfusión (PVC-3 mm) se cambió cada tres experimentos y todos los circuitos y reservorios fueron lavados después de ser utilizados. Se utilizó un filtro de 80 μm , intercalado en el circuito de perfusión, para evitar que, eventualmente, quedaran atrapados agregados celulares en el órgano.

2.1.2.- Corazón aislado.

Los conejos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (100 mg/Kg peso, intraperitoneal). Se abrieron el tórax y el abdomen a través de incisión mediana toracoabdominal. Los animales fueron anticoagulados con heparina sódica (100 U/Kg peso, i.v.) mediante punción de la cava inferior y se quitó el esternón y la porción ventral de las costillas para exponer el corazón y los pulmones. Se canuló la aorta ascendente, con una cánula de teflón (1,2 mm/18G), de forma que el extremo de la cánula se localizó inmediatamente por encima de la válvula aórtica, iniciándose la perfusión con solución de Krebs-Henseleit⁽¹⁹⁴⁾, y garantizándose de esta forma la perfusión prioritaria de las coronarias. El corazón fue extraído rápidamente y sumergido dentro de un baño siliconizado, oxigenado (O_2 95%, CO_2 5%) y termostaticado (37°C) conteniendo solución de Krebs-Henseleit suplementada con 5 mM de glucosa y 5% de BSA libre de ácidos grasos⁽¹⁹⁵⁾.

Después de lavar el órgano con tampón Krebs-Henseleit con el fin de remover la sangre coronaria, se agregó una infusión de ET-1 (0,027 $\mu\text{g}/\text{min}$) administrándola durante 30 min a la velocidad de 0,3 ml/min. Transcurridos 2 min desde el comienzo de la infusión de ET-1, se inyectaron 8×10^6 neutrófilos marcados con ^{51}Cr , suspendidos en tampón Krebs-Henseleit, en forma de bolo. La solución de Krebs-Henseleit, la ET-1 y los neutrófilos marcados recircularon en el sistema durante todo el resto del experimento. El ensayo se terminó mediante lavado de las células no adheridas con tampón Krebs-Henseleit (pH 7.4, temperatura 37°C), durante 5 min.

Con el fin de determinar la implicación de las proteínas de adhesión integrinas en la acumulación de neutrófilos inducida por la ET-1, se realizaron experimentos adicionales, preincubando durante 10 min los neutrófilos marcados con ^{51}Cr con el anticuerpo monoclonal TS1/18 y con un anticuerpo no específico P3X63, utilizado como control negativo.

Los corazones se homogeneizaron en 6 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, dividiéndose este volumen en tubos de poliestireno para su conteo en contador gamma. Una

lámina fina de los corazones fue cortada con un microtomo para realizar ensayo autorradiográfico. Para las autorradiografías se utilizó película de rayos X Kodak XS (Eastman Kodak, Madrid), y pantallas de intensificación SHX-GD-400 (Valca, Madrid), manteniéndose el corte del órgano sobre la película durante 15 días, a -70°C . El peso de las láminas fue tenido en cuenta en el cálculo final de la acumulación de neutrófilos.

2.2.- ESTUDIOS EN ANIMAL ENTERO

El animal fue anestesiado mediante la administración intravenosa de Ketamina (10 mg/kg)-xilazina (20 mg/Kg), siguiendo el protocolo de rutina del quirófano experimental de la Fundación Jiménez Díaz.

Los animales fueron traqueostomizados y se ventilaron mecánicamente (Miniature animal ventilator Harvard, Edenbridge, Kent, England). Seguidamente, se les realizó toracotomía y se expuso la aurícula izquierda por donde se infundió PBS de forma continua a la velocidad de 0.1 ml/min a 37°C , durante un periodo de estabilización de 30 min. Al final de este periodo, se administró ET-1 $0,0270 \mu\text{g}/\text{min}$ o PBS, por un periodo adicional de 30 min⁽¹⁹⁶⁾. Una vez finalizado este segundo periodo, los animales fueron sacrificados mediante una dosis letal de anestesia y el corazón fue lavado con 12 ml de solución salina (0.25 ml/min) a 37°C . Los corazones se congelaron en nitrógeno líquido para la posterior determinación de la actividad mieloperoxidasa. La presión arterial media se registró durante todo el experimento mediante un catéter en la arteria femoral, conectado a un registrador de presión (Letica, Scientific Instruments, Madrid).

2.2.1.- Medida de la actividad mieloperoxidasa.

Para la medida de la actividad mieloperoxidasa, una vez terminado el protocolo experimental "in vivo", se extrajo el corazón rápidamente, almacenándolo en N_2 líquido hasta su procesamiento. El método utilizado se basó en una modificación del utilizado por Weyrich y cols⁽¹⁹⁷⁾.

Después de pesar cada órgano, se homogenizó siguiendo tres pasos, el primero mecánico, el segundo consistente en dos criofracturas y el tercero mediante sonicación durante 20 seg. Se utilizó como tampón durante todo el proceso de homogenización, una solución de 50 mM de

fosfato potásico con 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a pH 6,0. Este último compuesto se empleó para evitar la interferencia en la determinación de mieloperoxidasa que pudiera ocurrir por la acción peroxidásica del hemo u otras ferroproteínas. De este modo, este procedimiento alcanzó una alta especificidad para mieloperoxidasa de origen leucocitario.

La suspensión se centrifugó a 3.000 rpm durante 20 min. La actividad mieloperoxidasa se midió en el sobrenadante, por colorimetría basada en la degradación de H_2O_2 . La mieloperoxidasa fue medida espectrofotométricamente tomando 200 μ l de sobrenadante y mezclándolos con 2,8 ml de tampón fosfato potásico 50 mM, que contenía 0,167 mg/ml de dicloruro de o-dianisidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y 0,0005% de peróxido de hidrógeno al 30% (Foret, Barcelona) a pH 6,0. El cambio de absorbancia a 460 nm se midió durante 5 min mediante un espectrofotómetro (U-2000, Hitachi).

Se definió una unidad de actividad de mieloperoxidasa como la cantidad de enzima que degrada un μ mol de peróxido por minuto, a 25°C. Para correlacionar la actividad mieloperoxidasa contenida en el órgano con el número de neutrófilos acumulados, se realizó una curva estándar de actividad mieloperoxidasa con un número de neutrófilos conocido.

2.2.2.- Adhesión de neutrófilos a segmentos arteriales de conejo

Los conejos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (100 mg/Kg. peso, intraperitoneal). Se realizó tóraco-laparotomía media con identificación de aorta y arterias renales para su disección. Una vez extraídos los vasos se sumergieron en tampón PBS, a 4°C y se retiró el tejido conectivo perivascular. Después de limpios, se cortaron en segmentos de 1 cm de longitud. Cada uno de los segmentos fue evertido con cuidado de no dañar la capa endotelial, quedando esta expuesta hacia el exterior. Los extremos se ligaron con una sutura de seda 4-0 para evitar el contacto de los neutrófilos con el interior del segmento (cara no endotelial). Una vez cerrados, se incubaron en Krebs-Henseleit a 37°C oxigenado con 95% O_2 y 5% CO_2 , en placas de 24 pocillos, esperándose 60 min para su estabilización. Transcurrido ese tiempo, los segmentos se lavaron 2 veces con Krebs-Henseleit y se incubaron en presencia de neutrófilos marcados con ^{51}Cr durante 30 min, a 37°C. Las incubaciones de los segmentos con neutrófilos se dividieron en grupo control, grupo con ET-1 ($10^{-7}M$) y grupo con el péptido quimiotáctico fMLP ($10^{-7}M$). Al finalizar el tiempo de coincubación, se eliminaron los neutrófilos no adheridos mediante lavados

sucesivos con PSS-Ca²⁺. Los neutrófilos adheridos a los segmentos se cuantificaron en un contador gamma.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales de adhesión similares a los descritos anteriormente, en presencia del anticuerpo monoclonal TS1/18. Como control negativo, se utilizó el anticuerpo no específico P3X63.

3.- ANALISIS ESTADISTICO

Todos los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media ($X \pm EEM$). Cada resultado corresponde a un mínimo de 7 experimentos en cada caso, excepto que se especifique otro valor. Cuando se compararon exclusivamente dos medias se utilizó el test de "t" de Student, de forma emparejada o no emparejada, según cada caso. Cuando se trataba de comparar varias distribuciones de valores, se utilizó un análisis de varianza de una entrada o un análisis de varianza de doble entrada, seguido de una prueba de comparación múltiple de media (Scheffé). En todos los casos, se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas si la p era menor de 0.05. Las pruebas estadísticas se efectuaron mediante los programas Stat View (Brainpower Inc, Calabasas, Ca) y Sigma (Horus, Madrid).

IV. Resultados

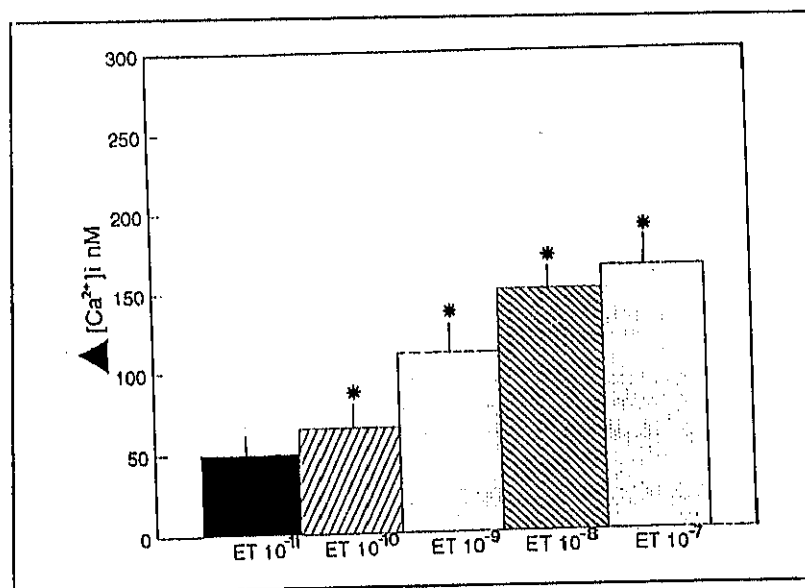
- En la primera parte de los experimentos de esta tesis se estudió el papel de la ET-1 como un posible activador de los neutrófilos, y la interacción entre ET-1 y NO, en la regulación de la actividad de estas células.

1.- Activación de los neutrófilos por ET-1

1.1.- Efecto de la ET-1 y el fMLP sobre la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en neutrófilos aislados.

La ET-1 indujo un aumento transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ en neutrófilos humanos aislados. Este aumento siguió una respuesta dosis-dependiente (Figura 8) (EC_{50} ET-1: $6 \times 10^{-10} M$). El aumento en $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la ET-1 $10^{-7} M$ fue similar en neutrófilos de rata y humanos ($\Delta[Ca^{2+}]_i = 119 \pm 15$ vs 165 ± 61 nM). Este efecto se inhibió por TMB-8, un inhibidor de la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares (% inhibición del aumento de Ca^{2+} inducido por ET-1 con TMB-8 $10^{-5} M$: 84.4 ± 3.4 ; $n=3$, $p < .01$). El aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 también fue inhibido cuando los neutrófilos se aislaron e incubaron en un medio libre de Ca^{2+} que contenía EGTA 2 mM. En presencia del agente quimiotáctico fMLP $10^{-7} M$ se observó un pico de $[Ca^{2+}]_i$ de características similares al inducido por ET-1, pero de mayor intensidad. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el fMLP tuvo un comportamiento similar a la de ET-1 en presencia de TMB-8 y EGTA.

Figura 8.- Dosis-respuesta del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 en neutrófilos humanos. El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ se calculó como incremento con respecto al basal para cada experimento individual. Los resultados están representados como media \pm EEM. * representa $p < .05$ respecto al basal. ($n=3$)



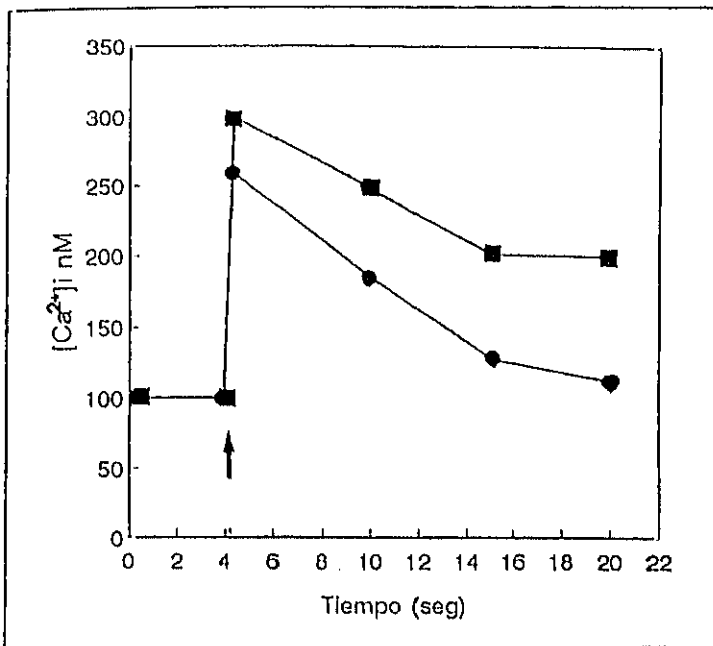


Figura 9.- Tiempo-respuesta del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 $10^{-7}M$ (●) y fMLP $10^{-7}M$ (■) en neutrófilos humanos. El momento en el que se añadieron los agonistas se indica con una flecha ($n=9$).

Para estudiar si este efecto de la ET-1 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ estaba mediado por una proteína del tipo Gi, se preincubaron los neutrófilos con toxina pertussis $1 \mu g/ml$, un inhibidor funcional de la proteína Gi, durante 3 horas, observándose una disminución del pico de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 y fMLP.

Posteriormente, con el objeto de estudiar qué tipo de receptor de ET-1 estaba involucrado en este incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1, se preincubaron los neutrófilos con BQ-123 $10 \mu M$ o IRL-1038 $1 \mu M$, antagonistas de los receptores ET_A y ET_B respectivamente, durante 10 min, y se estimularon con ET-1. Los resultados obtenidos parecen indicar que el tipo de receptor de ET-1 que media predominantemente este efecto es el de tipo A ya que al incubar los neutrófilos con BQ-123, se bloqueaba el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 ($\Delta[Ca^{2+}]_i: 47 \pm 5 nM$) ($n=9$ $p < 0.05$). Sin embargo no podemos descartar la posible existencia del receptor de tipo B de ET-1 ya que en algunos experimentos al bloquear con el BQ-123 hemos obtenido aumento de Ca^{2+} , al igual que cuando estimulábamos con ET-3 $10^{-7}M$ o con el agonista específico del receptor ET-B, IRL-1620 $10^{-7}M$, lo que indicaría que este efecto está mediado por el receptor ET_B ; y al bloquear este receptor con el antagonista del ET_B , IRL-1038, se bloqueó parcialmente

el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. Para poder aclarar este aspecto posiblemente, necesitaríamos utilizar unos antagonistas de los receptores de ET-1 más específicos para el caso de los neutrófilos. Por otra parte, la especificidad del antagonista del receptor de tipo B ha sido cuestionada⁽¹⁹⁸⁾.

Con el fin de eliminar la posible interferencia con la señal emitida por el fura 2 por parte de la agregación de los neutrófilos inducida por los distintos agonistas, se realizaron experimentos adicionales en neutrófilos adheridos a discos de cristal, con lo cual estos neutrófilos no pueden agregarse, siendo el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 idéntico al observado en neutrófilos en suspensión.

1.2.- Efecto de la ET-1 sobre la liberación de O_2^- por los neutrófilos.

Los neutrófilos generan anión superóxido cuando son expuestos a estímulos apropiados o procesos patológicos. Esta liberación acompaña al denominado "respiratory burst" ("estallido respiratorio"), característico de la activación masiva del neutrófilo.

Como se observa en la Figura 10, el activador de la proteína quinasas C, PMA $10^{-6}M$ y el fMLP $10^{-7}M$ indujeron un aumento significativo de la liberación de O_2^- en neutrófilos humanos en suspensión. Este efecto no se observó cuando los neutrófilos se activaron con ET-1 $10^{-7}M$.

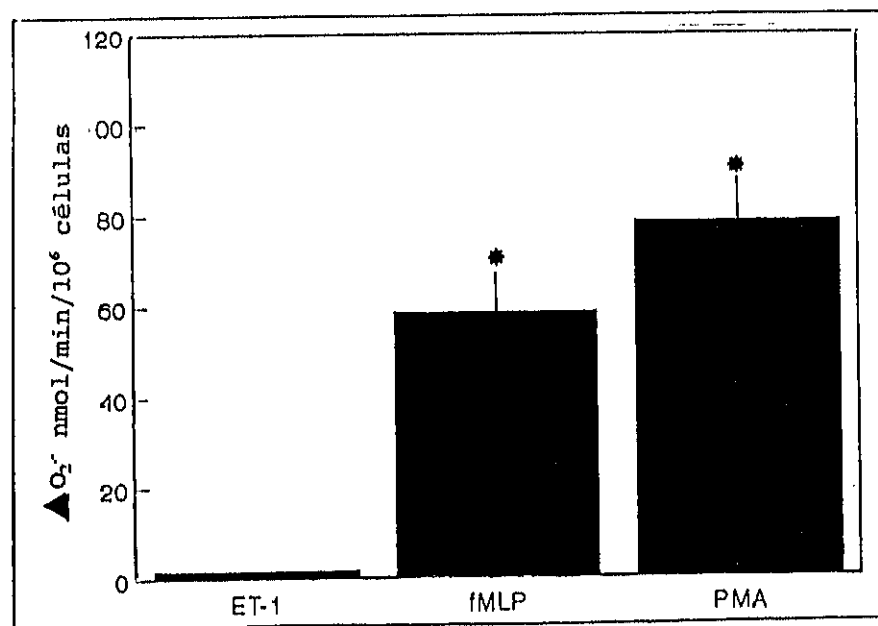


Figura 10.-Liberación de O_2^- por neutrófilos humanos en suspensión activados con fMLP, PMA o ET-1. Los resultados están representados como media \pm EEM ($n=5$). * $p < 0.05$ respecto a los neutrófilos activados con ET-1.

1.3.- Efecto de la ET-1 sobre la liberación de β -Glucuronidasa por los neutrófilos.

La liberación de enzimas lisosomales por el neutrófilo juega un papel fundamental tanto en la digestión de los microorganismos fagocitados como en el daño tisular que se produce en la inflamación y en procesos de isquemia-reperfusión. Medimos la liberación de β -glucuronidasa como marcador de la activación de los gránulos de los neutrófilos en respuesta a ET-1.

Como se observa en la Figura 11, en presencia de Citocalasina B ($5 \mu\text{g/ml}$ preincubada 5 min), la incubación de los neutrófilos con ET-1 10^{-7}M durante 30 min indujo la liberación de β -glucuronidasa. Un efecto similar al encontrado con la ET-1 se observó al activar los neutrófilos con fMLP 10^{-7}M durante 30 min.

La liberación de β -glucuronidasa requiere Citocalasina B como preactivador ya que en su ausencia no hay diferencias entre los neutrófilos en reposo (% Liberación respecto al total: 23%) y los estimulados solo con ET-1 (% Liberación respecto al total: 25%).

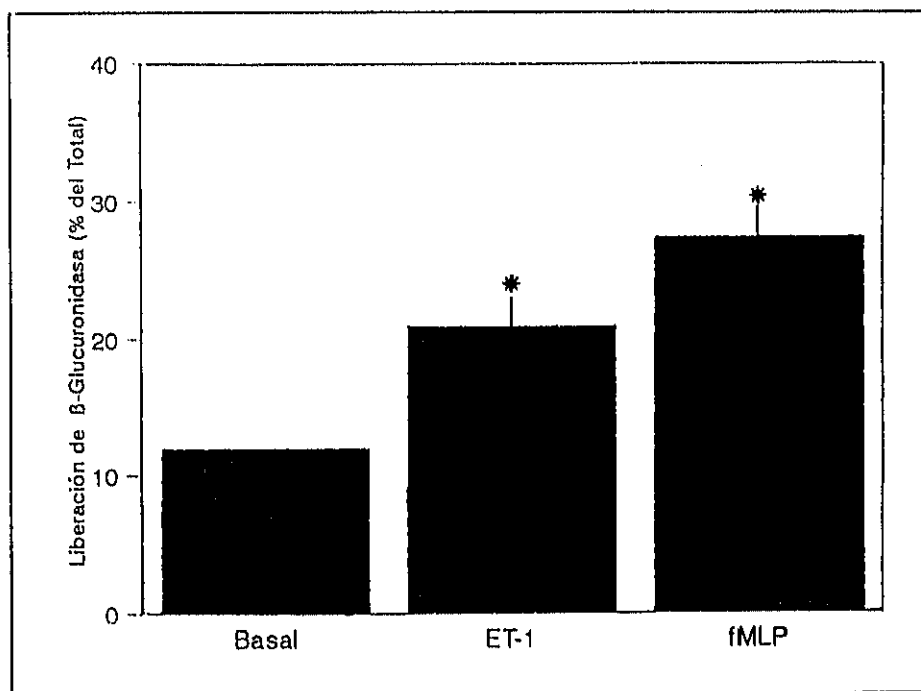


Figura 11.- Liberación de β -Glucuronidasa en neutrófilos estimulados con ET-1 10^{-7}M y fMLP 10^{-7}M . Los neutrófilos ($5 \times 10^6 / \text{ml}$) se preincubaron 5 min con Citocalasina B $5 \mu\text{g/ml}$ y se estimularon durante 30 min con fMLP o ET-1. Los resultados se expresan como la media \pm EEM ($n=9$). * $p < 0.05$

Al incubar los neutrófilos con BQ-123 e IRL-1038, para estudiar el receptor de ET que mediaba este efecto, obtuvimos la misma variabilidad que en el caso del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

1.4.- Efecto de la ET-1 sobre la polimerización de los filamentos de F-actina en los neutrófilos.

Los cambios que se producen en la movilidad de los neutrófilos durante la quimiotaxis están asociados a polimerización de los filamentos de actina, que se produce por un aumento en el contenido de F-actina y una disminución de la G-actina. Como se muestra en la Figura 12, ET-1 indujo un aumento en la intensidad de fluorescencia relativa de la NBD-falacidina, que fue máxima a los 45 segundos. El efecto de ET-1 fue similar al producido por el agente quimiotáctico fMLP.

Un dato adicional sugiere que la activación de la polimerización de F-actina inducido por ET-1 en los neutrófilos está mediada predominantemente por el receptor ET_A , ya que al bloquear este receptor con el antagonista específico BQ-123 $10 \mu M$, el efecto se inhibió (\blacktriangle % NBD-falacidina unida respecto al control: BQ+ET-1: 7.1 ± 1.9 %). Esta inhibición no ocurrió en el caso en que se bloqueó el receptor de tipo B con el antagonista IRL-1038 $1 \mu M$ (IRL-1038+ET-1: 27.4 ± 1.6 %). Sin embargo, cuando se incubaron los neutrófilos con el IRL-1038 solo se observó un cierto efecto agonista (\blacktriangle % NBD-falacidina unida respecto al control: 29 ± 3 %), por lo que, en forma similar a lo comentado en los experimentos de $[Ca^{2+}]_i$ y β -glucuronidasa, no podemos descartar la existencia del receptor de tipo ET_B en el neutrófilo.

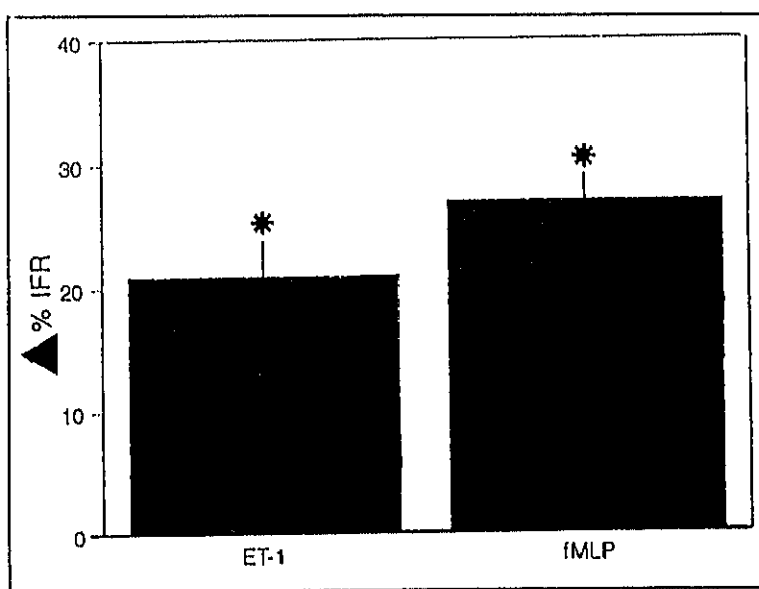


Figura 12.- Contenido en F-actina en neutrófilos estimulados con ET-1 y fMLP. Los resultados representan el % de Intensidad de fluorescencia relativa de la NBD-Falacidina respecto a los neutrófilos en condiciones basales. Los resultados se expresan como media \pm EEM. * $p < 0.05$ respecto al control ($n=9$).

2.- Papel del sistema NO/GMPc en la activación del neutrófilos por ET-1.

2.1.- Efecto de los distintos mecanismos que generan NO/GMPc sobre el aumento de calcio inducido por ET-1 y otros mediadores.

En función de datos anteriores de nuestro y otros laboratorios se consideró la posibilidad que el NO, por si mismo o a través de la formación de GMPc, pudiera influir en las características del aumento de calcio citosólico inducido por ET-1 en los neutrófilos.

Se realizaron experimentos incubando los neutrófilos en medio con L-arginina 10^{-4} M, como precursor de la síntesis de NO.

Como se muestra en la Figura 13, el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 10^{-7} M fue inhibido cuando las células se preincubaron en presencia de L-arginina 10^{-4} M. Esta inhibición fue específica enantioméricamente, ya que no se observó cuando los neutrófilos se preincubaron con D-Arg 10^{-4} M. La preincubación con L-arginina 10^{-4} M inhibió también el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por fMLP 10^{-7} M (Figura 14), indicando que no se trataba de un efecto específico sobre el mecanismo mediado por ET-1.

Con el fin de analizar la especificidad de los efectos de la L-arginina, se realizaron experimentos adicionales en presencia de dos antagonistas competitivos de esta en la formación de NO, NwNLA 5×10^{-4} M o L-NMMA 5×10^{-4} M. Cuando los neutrófilos se incubaron con los antagonistas de L-arginina, el aumento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 o fMLP no se vio afectado (Figuras 13 y 14). El efecto inhibitorio de la L-arginina 10^{-4} M sobre el aumento en $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 o fMLP fue revertido por L-NMMA 5×10^{-4} M pero no por NwNLA 5×10^{-4} M. La $[Ca^{2+}]_i$ basal (100 ± 10.3 nM) no se vio afectada por la preincubación con L-arginina o L-NMMA. En estos experimentos fue necesaria una preincubación de al menos 45 min para que se pudieran observar los efectos de la L-arginina o del L-NMMA.

El efecto inhibitorio de la L-arginina en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 se revirtió mediante la coincubación de los neutrófilos con un inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, azul de metileno (MB) 10μ M (128 ± 13 nM), lo que sugiere que el efecto de la L-arginina es dependiente del sistema NO/GMPc.

Con el fin de confirmar más directamente el papel del GMPc como regulador del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 o fMLP, se preincubaron los neutrófilos (10 min) con 8-Br-GMPc 100μ M, el cual inhibió significativamente el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$; 33 ± 7 nM con 8-Br-GMPc vs 160 ± 13 con ET-1). También se observó una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ basal (87

± 8 nM) en presencia de 8-Br-GMPc.

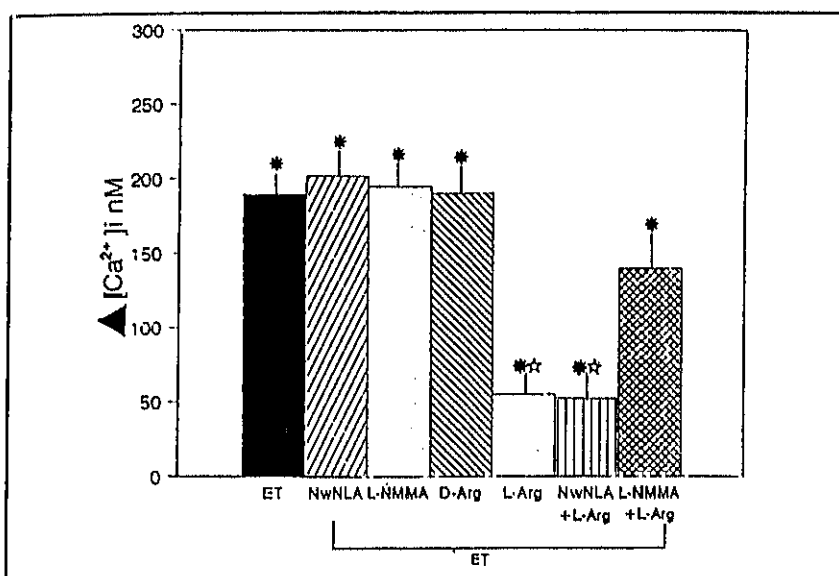


Figura 13.- Efecto de la L-arginina, D-arginina, L-NMMA y NwNLA en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, inducido por ET-1. El L-NMMA $5 \times 10^{-4} M$ pero no el NwNLA $5 \times 10^{-4} M$ revirtieron el efecto de la L-arginina. Los resultados se expresan como incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, con respecto al basal. Cada punto representa la media \pm EEM de 5 experimentos. * $p < 0.05$ con respecto al basal. ☆ $p < 0.05$ con respecto a ET-1.

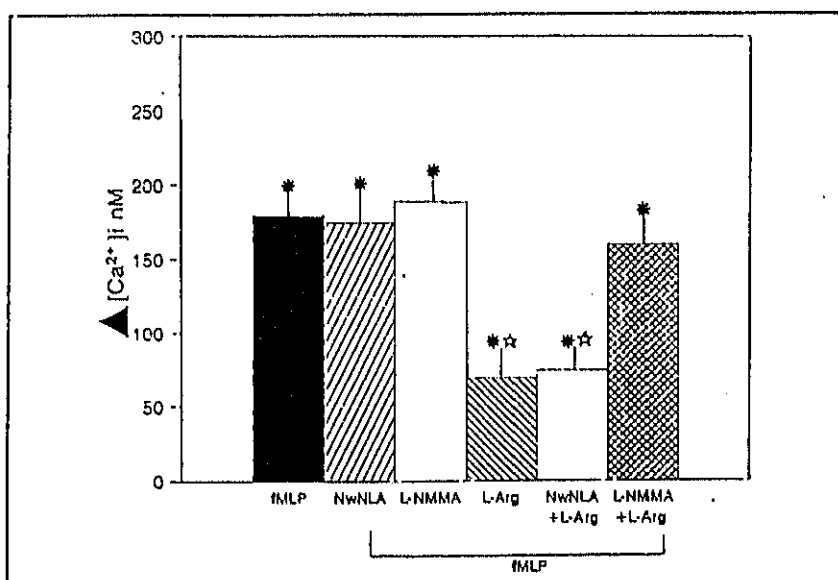


Figura 14.- Efecto de la L-arginina, D-arginina, L-NMMA y NwNLA en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, inducido por fMLP. El L-NMMA $5 \times 10^{-4} M$ pero no el NwNLA $5 \times 10^{-4} M$ revirtieron el efecto de la L-arginina. Los resultados se expresan como incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, con respecto al basal. Cada punto representa la media \pm EEM de 5 experimentos. * $p < 0.05$ con respecto al basal. ☆ $p < 0.05$ con respecto a fMLP.

El efecto inhibitor de la L-arginina se detectó en un rango amplio de concentraciones, incluso a concentraciones bajas de L-arginina (inhibición con L-arginina 10 nM: $40.1 \pm 7.4\%$, $n=4$, $p < 0.05$).

Finalmente, para asegurar que el efecto de la L-arginina estaba mediado por NO, se

estudió el papel del anión superóxido, ya que éste acelera el catabolismo del NO. Para ello se realizaron experimentos en los que se utilizaron concentraciones bajas de L-arginina, viendo si existía potenciación de la inhibición en presencia del "scavenger" de anión superóxido, superóxido dismutasa (SOD 30 U/ml). En presencia de SOD, la inhibición inducida por concentraciones bajas de L-arginina se potenció ($68.4 \pm 9\%$, $n=4$; $p < 0.05$ respecto a la inhibición obtenida con L-arginina 10 nM).

Con objeto de impedir la degradación del GMPc, alguno de los experimentos de medida de $[Ca^{2+}]_i$ fueron realizados en tampón PSS que contenía el inhibidor de la fosfodiesterasa IBMX (2 mM). No se observaron cambios en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 y fMLP en comparación con los resultados obtenidos en ausencia de IBMX (128 ± 12 nM). Se observó una pequeña disminución en el valor basal de $[Ca^{2+}]_i$ cuando se incubaron los neutrófilos con L-arginina e IBMX (Basal: $90,2 \pm 2,7$ nM).

- En la siguiente serie de experimentos se examinaron los mecanismos de interacción entre ET-1 y L-arginina/NO/GMPc en neutrófilos humanos. Estas interacciones se analizaron a tres niveles diferentes: a) el efecto de ET-1 en el metabolismo de la L-arginina a L-Citrulina. b) la influencia de la ET-1 en la producción de GMPc. c) Los mecanismos de la captación de L-arginina en el neutrófilo y el efecto de la ET-1 en esta captación, incluyendo la retroregulación de la captación de L-arginina en neutrófilos estimulados y no estimulados, mediante mecanismos dependientes de NO/GMPc.

2.2.- Metabolismo de la $[^3H]$ -L-arginina.

Analizamos la acumulación de $[^3H]$ -L-citrulina a partir de $[^3H]$ -L-arginina en presencia o ausencia de ET-1 $10^{-7}M$ o fMLP $10^{-7}M$. La generación de $[^3H]$ -L-citrulina desde $[^3H]$ -L-arginina, en neutrófilos no estimulados, aumentó en una pequeña proporción desde 2 a 30 min de incubación (Tabla 7). La acumulación de $[^3H]$ -L-citrulina se incrementó significativamente 30 min después de la adición de ET-1 o fMLP, con una disminución simultánea de los niveles de $[^3H]$ -L-arginina (Tabla 7). Este efecto se revirtió cuando los neutrófilos se preincubaron con L-NMMA $5 \times 10^{-4}M$ ($90.5 \pm 6\%$ inhibición), indicando que la conversión de $[^3H]$ -L-arginina a $[^3H]$ -L-citrulina ocurrió vía NO.

Posteriormente, se consideró la hipótesis de que el factor tiempo y el contenido total de

L-arginina en el neutrófilo tuviera un papel relevante en el metabolismo de este aminoácido a NO y L-citrulina. Con este fin, se realizaron experimentos que, como se observa en la tabla 7, revelaron que cuando los neutrófilos eran incubados en PSS con [³H]-L-arginina y L-arginina fría 100 μM por un periodo corto (2 min) y activados con ET-1 o fMLP (2 min), no se detectaba ningún incremento en los niveles de [³H]-L-citrulina. Por el contrario, cuando los neutrófilos fueron preincubados durante 30 min y la ET-1 o el fMLP se añadieron durante 2 min, los niveles de [³H]-L-citrulina se incrementaron significativamente (desde 46 ± 9 hasta 239 ± 18 nmol/5.10⁶ células). Por lo tanto, existen diferencias significativas en la producción de L-citrulina inducida por ET-1 en los neutrófilos, dependientes no tanto de la duración del efecto de la ET-1 como de el tiempo de pre-incubación de la L-arginina.

Tabla 7. Contenido de [³H]-L-arginina y [³H]-L-citrulina en neutrófilos humanos estimulados o no con ET-1 10⁻⁷M o fMLP 10⁻⁷M.

Tratamiento	Tiempo	[³ H]-L-arginina (nmol/5.10 ⁶ cels)	L-citrulina (nmol/5.10 ⁶ cels)
Basal	2 min	45 ± 2	4 ± 2
	30 min	279 ± 9	46 ± 9
ET-1	2 min	45 ± 2	4 ± 2
	30 min	129 ± 32*	190 ± 32*
fMLP	2 min	48 ± 3	4 ± 3
	30 min	149 ± 15*	172 ± 48*

Los neutrófilos (5x10⁶ células/ml) se incubaron con en PSS-Ca²⁺ conteniendo L-arginina (100 μM) y 1 μCi/ml [³H]-L-arginina en presencia o ausencia de ET-1 y fMLP. El contenido en [³H]-L-arginina y [³H]-L-citrulina de los neutrófilos lisados se cuantificó mediante cromatografía de intercambio iónico. Esta tabla representa los datos obtenidos mediante cromatografía de intercambio iónico. Los resultados se representan como media ± EEM. * p < 0,05 con respecto al basal correspondiente (n=6).

2.3.- Efecto de la ET-1 sobre la formación de GMPc en neutrófilos aislados

Como se muestra en la Tabla 8, la ET-1 no indujo cambios en los niveles basales de GMPc sobre los neutrófilos que previamente no habían sido incubados con L-arginina. En presencia de L-arginina 10⁻⁴M, la ET-1 10⁻⁷M indujo un aumento significativo en la producción

de GMPc en neutrófilos aislados. Un efecto similar se observó cuando los neutrófilos se activaron con fMLP 10^{-7} M (GMPc basal: 112 ± 2 fmol/ $5 \cdot 10^6$ células; GMPc en presencia de L-arginina 10^{-4} M + fMLP 10^{-7} M: 223 ± 7 fmol/ $5 \cdot 10^6$ células. $p < 0.01$). La L-arginina, per se, aumentó significativamente los niveles basales de GMPc. El incremento en el GMPc inducido por la ET-1 en neutrófilos preincubados con L-arginina fue inhibido por: la coincubación con el antagonista de la L-arginina, L-NMMA 5×10^{-4} M, y por el inhibidor de la guanilato ciclasa soluble, azul de metileno $10 \mu\text{g}$ (Tabla 8), lo que sugiere un papel crítico de la secuencia NO/Guanilato Ciclasa soluble. El incremento en los niveles de GMPc inducido por nitroprusiato sódico (NPS $10 \mu\text{M}$) no se modificó cuando se incubó junto con ET-1 o L-arginina por lo que se descarta una acción directa sobre la actividad de la guanilato ciclasa.

Tabla 8.- Niveles de GMPc (fmol/ $5 \cdot 10^6$) en neutrófilos humanos activados con ET-1 10^{-7} M. Los neutrófilos fueron preincubados en presencia o ausencia de L-arginina 10^{-4} M, L-NMMA 5×10^{-4} M durante 45 min, y MB $10 \mu\text{M}$ o NPS $10 \mu\text{M}$ durante 10 min, antes de añadir la ET-1. Todos las medidas se realizaron en presencia de IBMX 2 mM . Los resultados se presentan como medias \pm EEM; * $p < 0.05$ con respecto al basal; ** $p < 0.05$ con respecto a L-arginina ($n=7$).

	Basal	ET-1
Basal	113 ± 6	114 ± 3
L-arginina	$160 \pm 4^*$	$211 \pm 8^{**}$
L-NMMA	122 ± 7	119 ± 6
L-NMMA+L-arginina	105 ± 5	130 ± 8
MB	118 ± 3	122 ± 9
L-arginina+MB	109 ± 9	111 ± 6
NPS	$251 \pm 7^*$	$247 \pm 12^*$
NPS+L-arginina	$239 \pm 6^*$	$153 \pm 9^*$

Ya que la actividad de la NOS constitutiva es dependiente de Ca^{2+} -calmodulina, y según los experimentos previos, la ausencia de calcio extracelular inhibió el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por ET-1, se realizaron experimentos en medio sin Ca^{2+} conteniendo EGTA 2 mM , para estudiar el posible papel del Ca^{2+} en la producción de GMPc. La ausencia de Ca^{2+} extracelular no afectó los niveles basales de GMPc en los neutrófilos (126 ± 16 vs 120.3 ± 18 fmol/ $5 \cdot 10^6$ células en presencia o ausencia de Ca^{2+} respectivamente; $n=3$ cada grupo, pNS). Sin embargo, se observó una disminución significativa en los niveles de GMPc, en ausencia de Ca^{2+} extracelular en los neutrófilos incubados con L-arginina y estimulados con ET-1 (GMPc: 253 ± 19 ó 188 ± 16 fmol/ $5 \cdot 10^6$ células en presencia o ausencia de Ca^{2+} extracelular respectivamente, $n=4$ cada

grupo, $p < 0.05$).

2.4.- Efecto de la ET-1 sobre la captación de L-arginina en neutrófilos aislados y células endoteliales.

Como se observa en la Figura 15, el flujo de $[^3\text{H}]$ -L-arginina en el neutrófilo siguió una cinética tiempo-dependiente, siendo lineal hasta aproximadamente el minuto 30 y alcanzándose la máxima incorporación aproximadamente entre los 30-40 min.

La célula endotelial tiene una alta capacidad de producir NO, por lo que estudiamos también en la célula endotelial la cinética de captación de la L-arginina para comparar con la cinética encontrada en los neutrófilos. En las células endoteliales, el flujo de $[^3\text{H}]$ -L-arginina siguió también una cinética tiempo-dependiente alcanzándose la máxima incorporación a los 45-60 min (datos no mostrados).

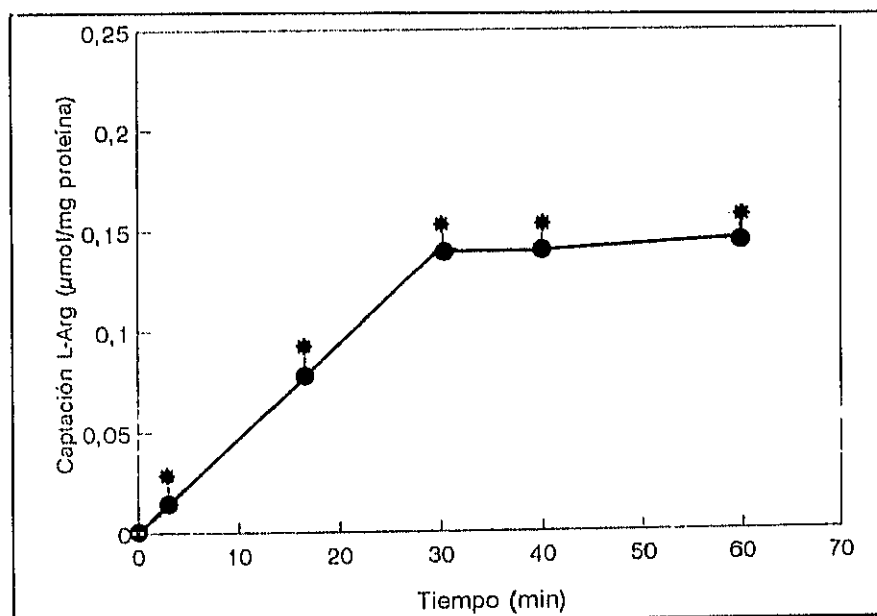


Figura 15.- Tiempo-respuesta en la captación de L-arginina por neutrófilos humanos. Los neutrófilos se incubaron en PSS- Ca^{2+} con L-arginina $100 \mu\text{M}$ a diferentes tiempos. Los resultados están representados como media \pm EEM. * $p < .05$ respecto al tiempo 0 ($n=10$).

La captación de la L-arginina, en los neutrófilos siguió una cinética de Michaelis-Menten, en la cual el flujo de L-arginina está definido por un flujo máximo (V_{max}) y por una constante de disociación aparente (K_m). El flujo de captación del aminoácido (V) se obtiene mediante la

ecuación:

$$V = V_{\max} (C_s / (C_s + K_m))$$

donde C_s es la concentración de L-arginina en el medio extracelular.

En los neutrófilos se identificaron dos componentes, uno Na^+ -dependiente y otro Na^+ independiente, ya que en ausencia de Na^+ en el medio de incubación la captación de L-arginina se vió parcialmente inhibida. Por el contrario, en otras células capaces también de generar NO, como es la célula endotelial, la no presencia de Na^+ en el medio de incubación no afectó el transporte de L-arginina, por lo que debe deducirse que disponen solamente de un transportador Na^+ -independiente.

Como se muestra en la Figura 16A, la captación de L-arginina por los neutrófilos tuvo una V_{\max} de $0.11 \pm 0.02 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína y una K_m de $1454 \pm 160 \mu\text{M}$. En un medio libre de Na^+ , la V_{\max} tendió a disminuir (V_{\max} : $0.059 \pm 0.01 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, $p < 0.05$ con respecto al medio con Na^+), y no se encontraron cambios en la K_m ($1635 \pm 200 \mu\text{M}$, no significativo respecto al medio con Na^+)(Figura 16B).

Está ampliamente demostrado que el ciclo del glutatión puede modificar el transporte de algunos aminoácidos en las células⁽¹⁹⁹⁾. Por ello, en estudios adicionales se examinó la posible implicación del glutatión como transportador de L-arginina en los neutrófilos mediante el ciclo de γ -glutamil. Para ello se preincubaron los neutrófilos (15 min y 4 h) en presencia de butioninsulfoximina (BSO 0.1 mM), inhibidor irreversible de la enzima γ -glutamilcisteina sintetasa, responsable de la síntesis de glutatión. El BSO no modificó la captación de L-arginina en los neutrófilos (V_{\max} , Basal: 0.13 ± 0.03 , BSO 15 min: 0.12 ± 0.09 , BSO 4h: $0.14 \pm 0.05 \mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)($n=5$), pudiéndose por lo tanto deducirse su independencia de mecanismos que involucren al glutatión.

Bajo las condiciones anteriormente mencionadas, la presencia de ET-1 10^{-7}M o de fMLP 10^{-7}M no modificó la cinética de captación Na^+ -dependiente o Na^+ independiente de la L-arginina en los neutrófilos. Estos resultados sugieren que el incremento en la producción de GMPC inducido por ET-1 en los neutrófilos no es debido a un aumento en la captación de L-arginina.

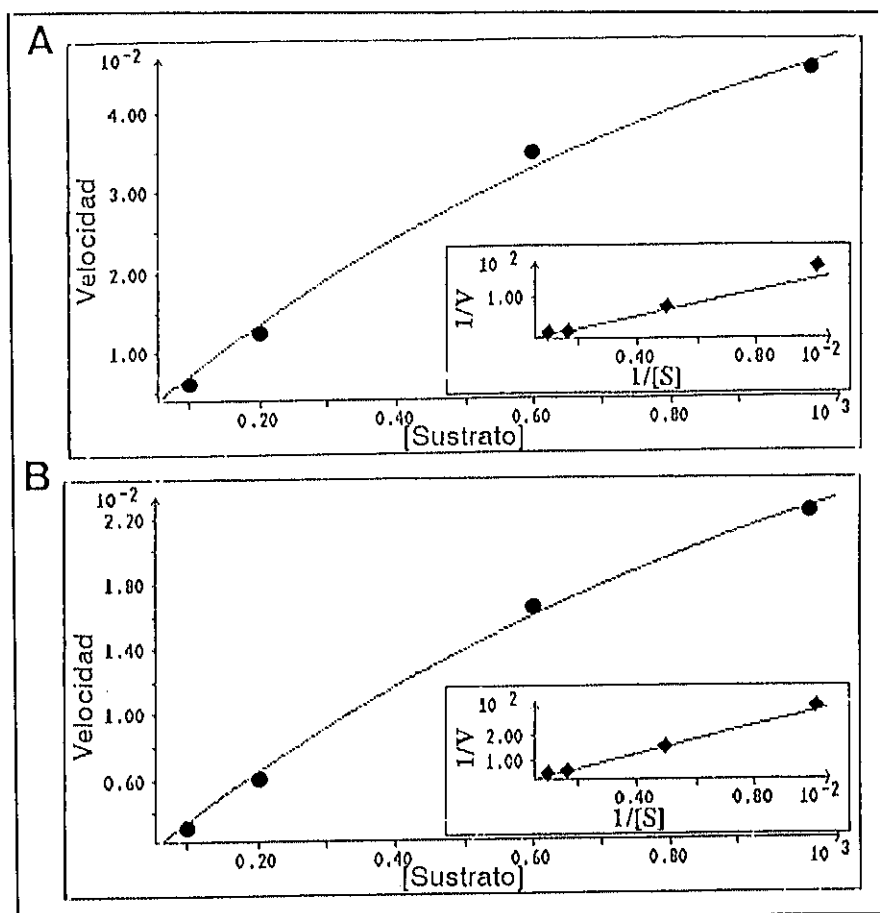


Figura 16.- Transporte de L-arginina concentración-dependiente en neutrófilos humanos. Neutrófilos ($5 \cdot 10^6$ /ml) se incubaron 30 min, 37°C en PSS- Ca^{2+} con diferentes concentraciones de L-arginina (10-1000 μM) y $1 \mu\text{Ci/ml}$ L- ^3H arginina (A). Se realizaron experimentos adicionales reemplazando NaCl por cloruro de Colina a concentraciones equimolares en el tampón PSS- Ca^{2+} (B). Los insets son una representación doble-recíproca del transporte de L-arginina con Na^+ (A) y sin Na^+ (B). $p < 0.01$ diferencia entre las curvas ($n=9$).

Para estudiar si existía un mecanismo retroregulador dependiente de producto final en la captación de L-arginina, se preincubaron los neutrófilos en presencia del antagonista de L-arginina, L-NMMA ($5 \times 10^{-4}\text{M}$, 45min) u 8-Br-GMPc (100 μM , 10 min).

Cuando se realizaron experimentos con L-NMMA en el medio de incubación se lavaron los neutrófilos con PSS, al finalizar la incubación de 45 min, para evitar el efecto competitivo por el transportador de membrana entre el L-NMMA y la L-arginina extracelulares, asegurando así que el efecto del L-NMMA sea debido a su acción sobre la NOS.

La cinética de captación de L-arginina por los neutrófilos no se modificó en presencia de L-NMMA (Tabla 9). Sin embargo, cuando los experimentos se hicieron en presencia de ET-1, la Km disminuyó significativamente, indicando que cuando se inhibe la formación de NO por el neutrófilo, la ET-1 aumenta la afinidad de la L-arginina por su transportador.

Tabla 9.- Valores de Km y Vmax en la cinética de captación de L-arginina en los neutrófilos.

	Km (μM)	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)
Basal	1564 \pm 160	0.11 \pm 0.02
ET-1	1532 \pm 128	0.14 \pm 0.01
L-NMMA	1560 \pm 165	0.12 \pm 0.02
L-NMMA+ET-1	158 \pm 25 ^{*A}	0.19 \pm 0.04

Los neutrófilos se preincubaron en presencia de $5 \cdot 10^{-4}$ M L-NMMA, 45 min, y 8-Br-GMPc 100 μM , 10 min antes de comenzar la captación de [^3H]-L-arginina. Los resultados se presentan como medias \pm E.E.M; * $p < 0.05$ respecto a L-NMMA sola; ^A $p < 0.05$ respecto a el basal ($n=6$).

Con el fin de analizar si el transportador de L-arginina podía regularse por el GMPc que, como ya hemos explicado anteriormente, es el mensajero celular de la mayoría de las acciones del NO, se realizaron experimentos adicionales de captación de L-arginina en neutrófilos incubados con el analogo estructural del GMPc, 8-Br-GMPc. Cuando los neutrófilos se incubaron en presencia de 8-Br-GMPc no se produjeron cambios en la Vmax ni en la Km (Km: $1520 \pm 193 \mu\text{M}$; Vmax: $0.12 \pm 0.03 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína).

3.- Efecto de la ET-1 sobre la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular.

La interacción de los neutrófilos circulantes con el endotelio es un fenómeno crítico en varios procesos patológicos como isquemia miocárdica y renal, y procesos inflamatorios en los cuales también se han observado niveles elevados de ET-1 en plasma o en los que pueden ocurrir elevaciones locales de la concentración de ET-1. Según los resultados descritos, que muestran que la ET-1 estimula varios mecanismos de activación en los neutrófilos; en la segunda parte de esta tesis analizamos los efectos de la ET-1 sobre la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales en cultivo y sobre la acumulación de neutrófilos en el corazón.

3.1.- Efecto de la ET-1 sobre la adhesión de neutrófilos a células endoteliales en cultivo.

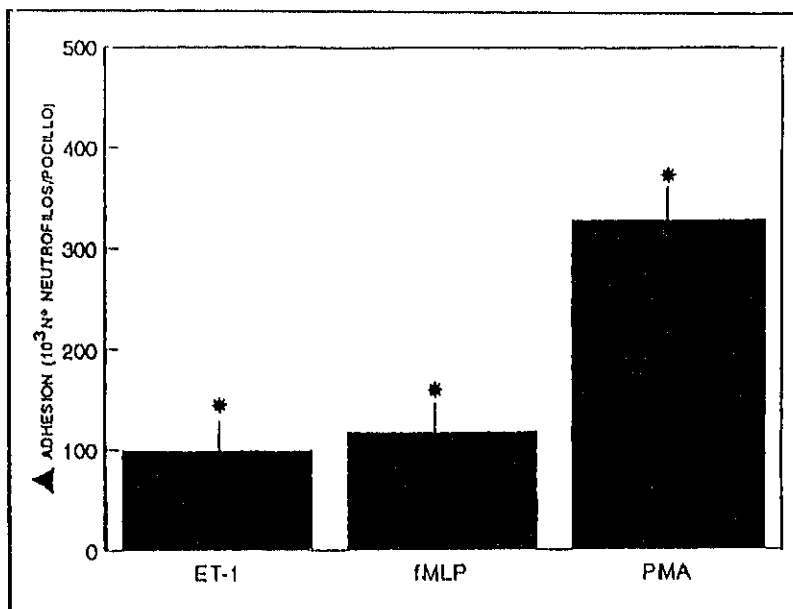
Como se observa en las Figuras 17 y 18, la ET-1 10^{-7} M estimuló la adhesión de neutrófilos humanos marcados con ^{51}Cr a células endoteliales bovinas en cultivo. Esta activación en la adhesión de los neutrófilos inducida por ET-1 fue equivalente a la inducida por el factor quimiotáctico, fMLP 10^{-7} M y menor que la inducida por el éster de forbol, PMA 10^{-6} M, que utilizamos como control positivo (Figura 18). Un aumento de la adhesión de los neutrófilos también se observó utilizando 10^{-8} M y 10^{-9} M de ET-1 (\blacktriangle de la adhesión de ^{51}Cr -neutrófilos: $9.06 \times 10^4 \pm 8.1 \times 10^3$ y $7.13 \times 10^4 \pm 5.7 \times 10^3$ neutrófilos/pocillo). ET-1 10^{-10} M o dosis menores no indujeron un aumento consistente en la adhesión de neutrófilos ($5.23 \times 10^4 \pm 4.6 \times 10^4$ neutrófilos/pocillo pNS).

Con el fin de analizar si el efecto de la ET-1 en el fenómeno de adhesión era sobre los propios neutrófilos o sobre las células endoteliales, se realizaron experimentos de adhesión de neutrófilos a superficies sintéticas. La ET-1 activó la adhesión de los neutrófilos sobre las superficies sintéticas, confirmando el efecto directo de la ET-1 sobre el neutrófilo (\blacktriangle en la adhesión de ^{51}Cr -neutrófilos $1.94 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^4$ neutrófilos/pocillo, $n=6$ $p < .01$). No se observó un incremento significativo de la adhesión cuando fueron las células endoteliales solas las que se incubaron con ET-1 10^{-7} M, 10 minutos (\blacktriangle en la adhesión de neutrófilos: 27000 neutrófilos/pocillo, $n=9$, pNS). No se realizaron experimentos preincubando a los neutrófilos con ET-1 10^{-7} M ya que la ET-1 indujo agregación de los neutrófilos⁽²⁰⁰⁾, lo que dificultaba la interpretación de los resultados.

También se observó un efecto significativo en la adhesión de neutrófilos humanos a células endoteliales de cordón umbilical humano (\blacktriangle en la adhesión de neutrófilos: $1.2 \times 10^5 \pm 1 \times 10^4$ neutrófilos/pocillo, $n=5$ $p < 0.01$), descartando así un posible efecto inespecífico debido a la heterogeneidad de las especies. Para demostrar más la especificidad del efecto de la ET-1, en experimentos posteriores realizados *in vivo*, se observó que la ET-1 indujo la acumulación de neutrófilos de conejo en corazón aislado de conejo. Asimismo, no se observaron cambios en la adhesión de neutrófilos inducida por otros agentes vasoconstrictores como la Angiotensina II (Ang II, 10^{-7} M) (\blacktriangle en la adhesión de neutrófilos: $1.83 \times 10^4 \pm 3.2 \times 10^3$ neutrófilos por pocillo, p NS) o la arginina vasopresina (AVP 10^{-7} M) ($6.77 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^3$ neutrófilos por pocillo, p NS) lo que

indica que el efecto adhesivo es específico para la ET-1.

Figura 17.- Adhesión de neutrófilos a células endoteliales. Neutrófilos activados con ET-1 $10^{-7}M$, fMLP $10^{-7}M$ o PMA $10^{-6}M$. Los resultados están representados como media \pm EEM ($n=8$). * $p < 0.05$ con respecto al basal. La adhesión basal fue: $297 \pm 8 \cdot 10^3$ neutrófilos/pocillo después de 30 min de incubación.



3.2.- Caracterización de la adhesión inducida por ET-1 desde el punto de vista de las proteínas de adhesión.

La posible implicación del complejo CD11/CD18 en la estimulación de los neutrófilos con ET-1 se estudió mediante la preincubación de estos con un anticuerpo monoclonal específico (TS1/18), contra la subunidad común β . Como se muestra en la Figura 19, la adhesión mediada por ET-1 se bloqueó en presencia del anticuerpo contra la cadena β del complejo de integrinas. El anticuerpo TS1/18 también redujo la adhesión basal de neutrófilos al endotelio, probablemente debido a la presencia de un cierto grado de activación no específica que ocurrió durante el procedimiento de aislamiento. La preincubación de los neutrófilos con una inmunoglobulina no específica, P3X63, no tuvo efecto en la adhesión de los neutrófilos inducida por ET-1 (% inhibición: 2 ± 1.4 , pNS). Una vez que se identificó en los experimentos anteriores que el complejo CD11/CD18 era un mediador importante en la adhesión de neutrófilos mediada por ET-1, examinamos que posibles subunidades α , podían estar involucradas en este proceso. Como se muestra en la Figura , se observó una inhibición significativa de la adhesión de los neutrófilos a la célula endotelial con anticuerpos monoclonales anti-CD11a, anti-CD11b y anti-CD11c. La inhibición inducida por anti-CD11a, anti-CD11b y anti-CD11c fue parcial.

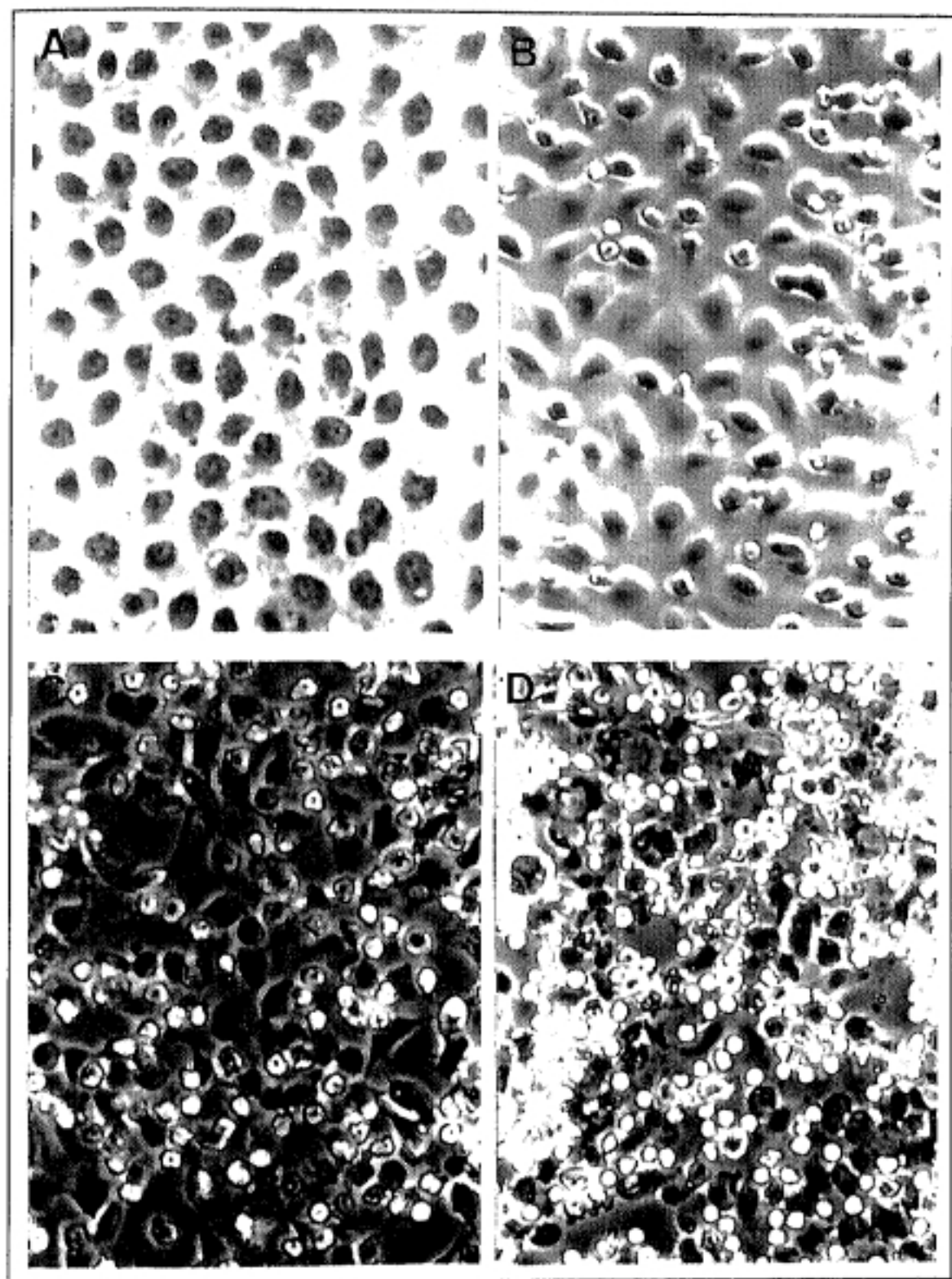


Figura 18.- Microfotografía de neutrófilos adheridos a células endoteliales en cultivo, realizada en un microscopio de contraste de fase (200X). A: Células endoteliales controles sin neutrófilos adheridos. B: Adhesión basal de neutrófilos a células endoteliales. C: Adhesión de neutrófilos a células endoteliales estimulada con ET-1 $10^{-7}M$. D: Adhesión de neutrófilos a células endoteliales estimulada con PMA $10^{-6}M$.

La inhibición por TS1/18 fue casi completa (80-90%), sugiriendo que todos CD11a/CD18, CD11b/CD18 y CD11c/CD18 tienen una función en la adhesión de los neutrófilos mediada por ET-1. Este aspecto se confirmó por la observación de que una mezcla de anticuerpos monoclonales contra LFA-1, Mac-1 y p150,95 tuvieron un efecto inhibitorio aditivo sobre la adhesión (Figura 19).

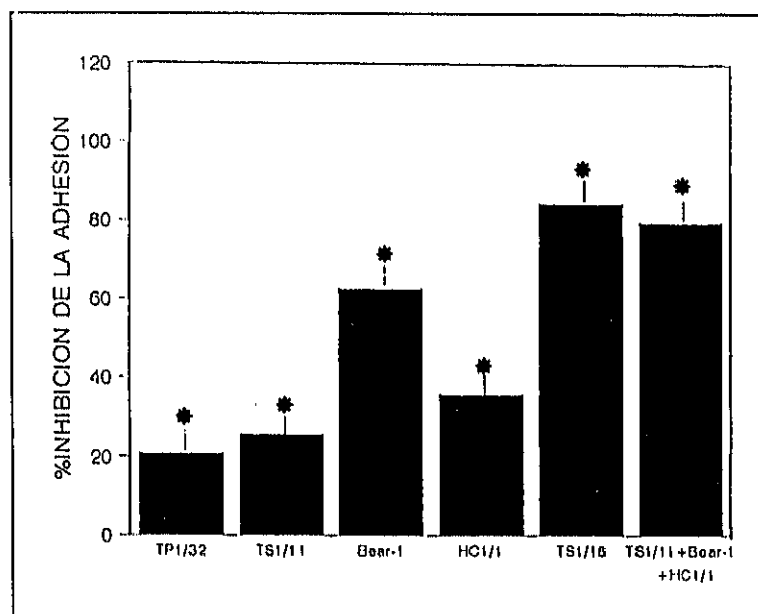


Figura 19.- Caracterización de la adhesión inducida por ET-1 mediante anticuerpos monoclonales contra las glicoproteínas de adhesión, anti-CD11a/CD18 (TP1/32 y TS1/11), anti-CD11b/CD18 (Bear-1), anti-CD11c/CD18 (HC1/1), y anti-CD18 (TS1/18). Los resultados están representados como media \pm EEM (n=8). * $p < .05$ con respecto al basal.

El análisis de la citometría de flujo demostró que la ET-1 (n=4) incrementó la expresión de la subunidad β de las integrinas, CD18, en un grado similar que el inducido por fMLP (Figura 20 A). Se observó un aumento en la expresión de CD11b en presencia de ET-1 (Figura 20 B), mientras que no hubo un efecto significativo de la ET-1 sobre la expresión en la superficie del neutrófilo de CD11a y CD11c (datos no mostrados).

En neutrófilos estimulados con el éster de forbol, PMA, aumentó tanto la expresión de Mac-1 como de LFA-1 (datos no mostrados).

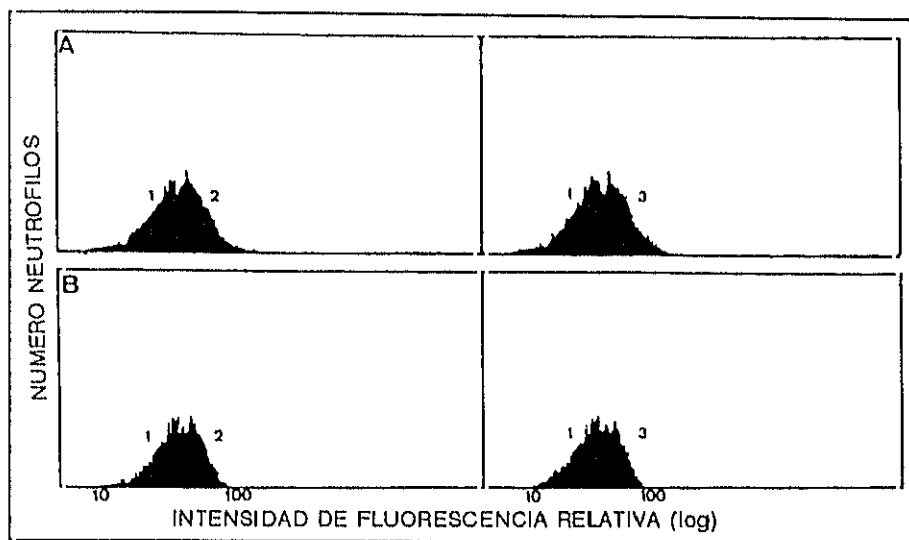


Figura 20.- A, Expresión del antígeno CD18 en la superficie de neutrófilos controles (1), activados con ET-1 10^{-7} M (2), o con fMLP (3). La Figura representa un trazado real de un experimento típico. B, Expresión del antígeno CD11b/CD18 en la superficie de neutrófilos controles (1), estimulados con ET-1 10^{-7} M (2) o fMLP 10^{-7} M. La Figura representa un trazado real de un experimento típico.

3.3.- Efecto de la ET-1 sobre la adhesión de neutrófilos a corazón aislado.

La infusión constante de ET-1 ($0.027 \mu\text{g}/\text{min}$) aumentó la acumulación de neutrófilos de conejo en el corazón aislado y perfundido de conejo (acumulación de neutrófilos no estimulados: $1.5 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^5$ neutrófilos; neutrófilos estimulados con ET-1: $4.2 \times 10^6 \pm 3.8 \times 10^5$ neutrófilos; $n=5$, $p < .01$) (Figura 21). No se observaron cambios en la presión de perfusión coronaria cuando se administró esta dosis de ET-1 (presión de perfusión: 100 ± 21 y 104 ± 26 mm HG en ausencia y presencia de ET-1, respectivamente, p NS).

Para descartar un posible efecto inespecífico de atrapamiento de los neutrófilos inducido por el efecto vasoconstrictor de la ET-1, se realizaron dos experimentos: 1) Se incubaron los neutrófilos con un anticuerpo monoclonal, TS1/18, contra el antígeno CD18 común de las β_2 integrinas expresadas en la superficie del neutrófilo implicados en los procesos de adhesión, 10 minutos antes y durante la infusión de ET-1 en la circulación. TS1/18 inhibió la acumulación de neutrófilos inducida por ET-1 ($65 \pm 15\%$ de inhibición, $p < .01$), lo que sugiere un papel del complejo CD11/CD18 en este efecto. No se encontró inhibición cuando los neutrófilos se

incubaron con el anticuerpo no específico P3X63 ($1.2 \pm 0.8\%$ de inhibición; p NS). 2) Se infundieron eritrocitos marcados con ^{51}Cr en ausencia o presencia de ET-1 ($n=3$). No se encontraron diferencias significativas en la acumulación de ^{51}Cr en ausencia o presencia de ET-1 (^{51}Cr total: 20313 ± 1300 y 23110 ± 1810 cpm/ g de corazón, respectivamente, p NS). En todos los experimentos comparativos, todos los órganos fueron obtenidos del mismo animal y los neutrófilos marcados con ^{51}Cr pertenecían al mismo grupo de células.

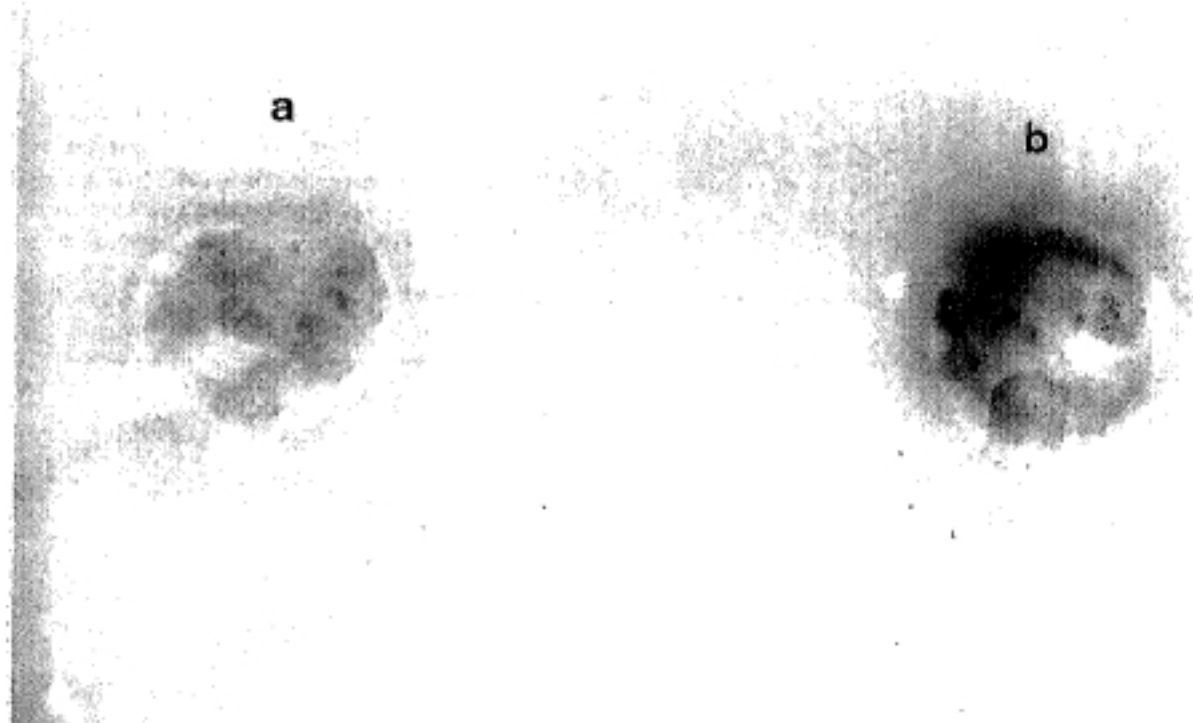


Figura 21: Autoradiografías de corazones aislados y perfundidos con ^{51}Cr -neutrófilos, exponiéndose el corte del órgano sobre la película durante 15 días, a -70°C . a) corazón control; b) corazón aislado y perfundido con ET-1 ($0,0270 \mu\text{g}/\text{min}$).

Para descartar una posible interacción inespecífica entre TS1/18 y los neutrófilos de conejo, se realizaron experimentos preincubando neutrófilos humanos con TS1/18 antes de infundirlos en el corazón del conejo ($n=3$). La ET-1 estimuló la acumulación de neutrófilos humanos en el corazón de conejo de manera similar a la observada con los neutrófilos de conejo

celular en frascos de cultivo.

Las células endoteliales humanas se aislaron de la vena de cordones umbilicales mediante tratamiento con 0,5 mg/ml de colagenasa tipo II (Sigma) incubadas a 37°C durante 30 min. Estas células se cultivaron en pocillos cubiertos de una matriz de gelatina (0.2%). El medio de cultivo utilizado fue RPMI con 20% de suero de ternera fetal y con 10 µg/ml de factor de crecimiento endotelial.

Las células en cultivo se mantuvieron en una incubadora humificada a 37°C y con 95% O₂ y 5% CO₂, cambiándose el medio de cultivo cada dos días. La identificación de las células se realizó microscópicamente mediante su apariencia pavimentosa (Figura 7) y bioquímicamente mediante la detección de Factor VIII. Para los distintos experimentos, las células endoteliales se utilizaron entre el 1º y 3º pasaje (realizados mediante tripsinización de las células obtenidas en el cultivo primario, con tripsina/EDTA) y en estado de confluencia completa en monocapa. Los experimentos se realizaron en células crecidas en cajas de 24 pocillos o en cajas Petri individualizadas.

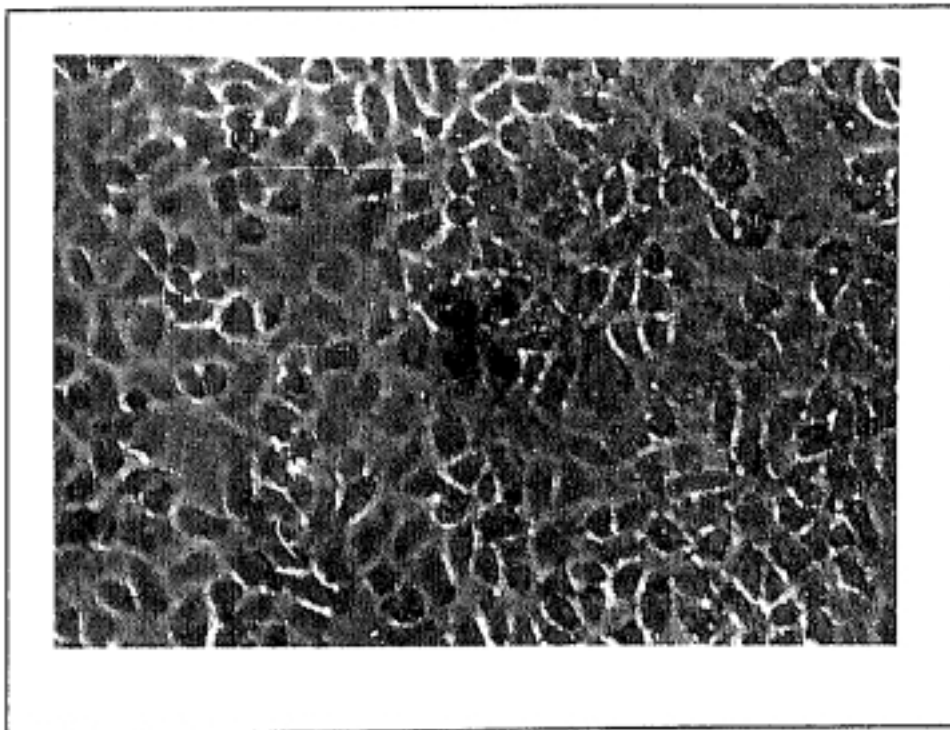


Figura 7.- *Fotografía de un cultivo primario de células endoteliales bovinas en confluencia.*

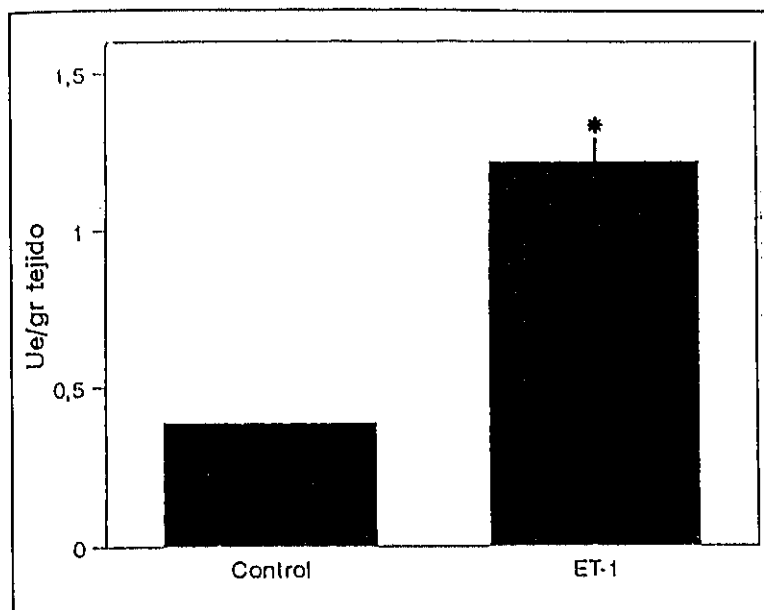


Figura 23.- Actividad de mieloperoxidasa (Ue/gr tejido) en corazones de conejo aislados y sometidos a una infusión intracardiaca de ET-1 (0,027 $\mu\text{g}/\text{min}$) ó vehiculo. * $p < 0,001$ en relación al control ($n=9$).

3.5.- Adhesión de neutrófilos a segmentos arteriales.

El objetivo de este último grupo de experimentos fue examinar el papel de la ET-1 como estimulante de la adhesión de neutrófilos a la superficie endotelial de vasos aislados. Para ello, y antes de realizar los experimentos, los vasos arteriales se dispusieron de tal forma que se mostrara en la superficie externa, la capa endotelial.

La ET-1 10^{-7}M estimuló la adhesión de ^{51}Cr -neutrófilos a la aorta, arterias renales y femorales aisladas de conejo. La adhesión inducida por ET-1 fue equivalente a la mediada por el péptido quimiotáctico, fMLP 10^{-7}M .

La implicación del complejo CD11/CD18 en la adhesión de neutrófilos estimulada con ET-1 se examinó utilizando, al igual que en los experimentos de órganos perfundidos, el anticuerpo monoclonal contra el antígeno CD18, TS1/18. Al bloquear la cadena β del complejo CD11/CD18 se inhibió completamente la estimulación de la adhesión de los neutrófilos mediada por la ET-1. El mismo resultado se obtuvo con el fMLP. La presencia del anticuerpo no específico, P3X63, no modificó la adhesión inducida por la ET-1 o fMLP.

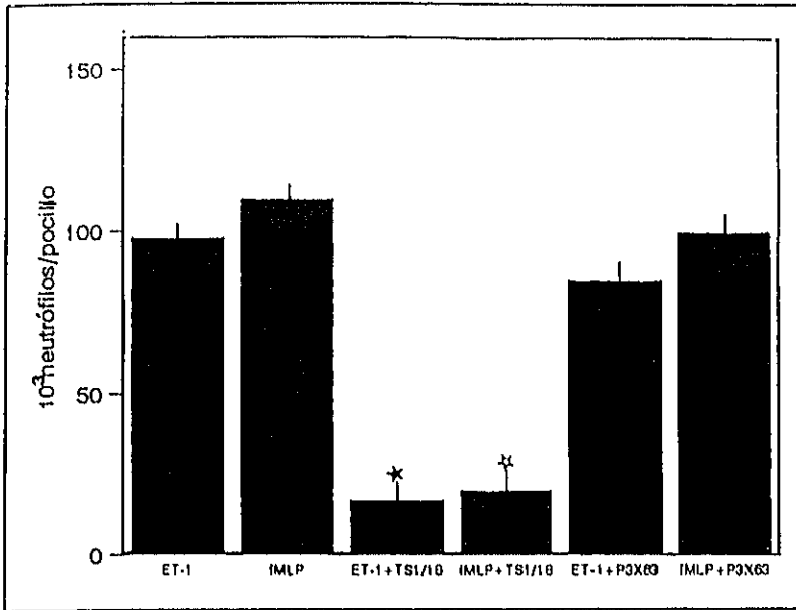


Figura 24: Adhesión de ^{51}Cr -neutrófilos a segmentos arteriales aislados, en presencia o ausencia de ET-1, fMLP, ET-1+TS1/18, fMLP+TS1/18, ET-1+P3X63, fMLP+P3X63. $\star p < 0,001$ respecto a ET-1; $\star p < 0,001$ respecto a fMLP.

V. Discusión

Esta tesis contiene una serie de hallazgos originales de importancia potencial en procesos fisiopatológicos en los que existe una interacción entre el endotelio vascular y los neutrófilos. En una primera serie de experimentos analizamos si un péptido vasoactivo, la ET-1, era capaz de activar a los neutrófilos y la regulación de esta actividad inducida por ET-1 mediante el sistema NO/GMPc.

Existen diversas pruebas que muestran la existencia de una interacción entre ET-1 y NO a varios niveles. Así, distintos activadores de la guanilato ciclasa (soluble y particulada) como son NO y ANF (Factor natriurético atrial) causan una relajación potente durante la contracción inducida por ET-1 en vasos aislados, lo que sugiere un antagonismo funcional entre el NO y la ET-1. Por otro lado se ha demostrado que el NO puede ser un inhibidor de la estimulación de la liberación de ET-1, ya que una elevada producción endotelial de NO actúa como un mecanismo regulador negativo de la producción de ET-1. Un tercer nivel de interacción sería aquel mediante el cual al activarse receptores de ET-1 en las células endoteliales, se produce la liberación de prostaciclina, EDRF/NO y EDHF (Factor hiperpolarizante derivado del endotelio). Este último mecanismo actuaría como un sistema de control en situaciones en las que se encuentran niveles elevados de ET-1, en las que la liberación de NO disminuiría no solo la producción de ET-1 sino también su actividad vasoconstrictora. Como ya hemos indicado en la introducción de esta tesis, la ET-1 no sólo influye en el tono vascular sino que también se han encontrado niveles elevados de ET-1 en procesos de inflamación y en los procesos de isquemia-reperfusión de diversos órganos como el riñón o el miocardio. Además, es bien conocida la implicación que tienen los neutrófilos en el daño tisular producido durante estos estados patológicos y la regulación de éstos mediante el NO.

1.- La ET-1 activa a los neutrófilos humanos.

Los resultados obtenidos en este primer grupo de estudios demuestran: 1) que el péptido vasoactivo ET-1 es capaz de activar a los neutrófilos, induciendo: a) un aumento transitorio de $[Ca^{2+}]_i$; b) polimerización de los filamentos de F-actina; c) liberación de β -glucuronidasa. Sin embargo, la ET-1 no fue capaz de inducir la liberación de radical superóxido por los neutrófilos.

Existe un solo trabajo previo en la literatura que demuestre cómo la ET-1 puede actuar sobre el neutrófilo⁽¹⁸⁴⁾. En este trabajo se demuestra que la ET-1 potencia la producción de ión superóxido inducida por fMLP, un potente agente quimiotáctico de los neutrófilos. Sin embargo, los autores no encontraron cambios en el $[Ca^{2+}]_i$ en neutrófilos tratados solamente con ET-1.

La diferencia en el aumento transitorio de Ca^{2+} encontrado por nosotros y los obtenidos por Ishida y cols puede atribuirse al diferente grado de repleción de Ca^{2+} en los depósitos celulares en las dos preparaciones experimentales. En este sentido, hay que considerar que durante el proceso de extracción de los neutrófilos, se utilizan medios que no contienen calcio para así disminuir su grado de activación previo al estudio. En nuestros experimentos, con el fin de obtener nuevamente una situación lo más fisiológica posible, replecionamos de nuevo los neutrófilos de este ión mediante una preincubación de 30 minutos en un medio fisiológico que contiene una concentración de calcio de 2 mM. Sin embargo, en los experimentos realizados por Ishida y cols, no se siguió este mismo procedimiento.

El efecto poco duradero en los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 puede ser debido a que la ET-1 produce una rápida agregación de los neutrófilos⁽²⁰⁰⁾. Para confirmar esta hipótesis, se realizaron nuevos experimentos utilizando neutrófilos adheridos a cristal. En este grupo de ensayos, observamos como en los neutrófilos adheridos la forma de los cambios en el $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la ET-1 era diferente que la obtenida con neutrófilos en suspensión, siendo más duradero el aumento de Ca^{2+} en los neutrófilos adheridos a cristal.

El hecho de que el aumento transitorio en $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 se inhibió no solo por el bloqueo de la salida de Ca^{2+} desde los depósitos celulares mediante TMB-8, sino también en un medio libre de Ca^{2+} que contenía EGTA, sugiere que la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular es necesaria para activar el mecanismo de liberación desde los orgánulos subcelulares ó que en presencia de EGTA se produce una rápida depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .

En trabajos posteriores se dan datos controvertidos sobre la acción de la ET-1 en la actividad no sólo de los neutrófilos sino también de otros tipos de células sanguíneas como los macrófagos y monocitos. Existen varias publicaciones con distintas interpretaciones sobre el efecto de la ET-1 sobre la producción de iones superóxido por los neutrófilos^(201,202,203,174). Otros autores discrepan sobre el efecto de la ET-1 en la quimiotaxis de los monocitos^(174,176), y recientemente se ha publicado un artículo que demuestra el efecto de la ET-1 en la migración de los neutrófilos⁽²⁰⁴⁾. Las diferentes condiciones experimentales que utiliza cada grupo, pueden justificar

estas discrepancias.

Es interesante observar que nuestros resultados sobre la liberación de O_2^- por los neutrófilos estimulados con ET-1, al igual que los obtenidos por Ishida y cols⁽¹⁸⁴⁾, demuestran que la ET-1 no aumenta per se el O_2^- , mientras que sí provoca fenómenos como la liberación de una enzima degradativa de la matriz extracelular, la β -Glucuronidasa, y la polimerización de la actina, necesaria para la movilidad transvascular y la agregación del neutrófilo. En su conjunto, estos datos sugieren que la ET-1 produce solo una activación parcial de los neutrófilos, dirigida sobre todo a manifestar sus propiedades adhesivas, agregantes y de motilidad sin provocar una reacción masiva de los mismos.

El efecto inmediato que la ET-1 provoca sobre la polimerización de los filamentos de actina, es muy importante ya que para que un factor quimiotáctico o un ester de forbol inicie su respuesta biológica en los neutrófilos, entre las que se encuentran cambios en la morfología, formación de pseudópodos, movilidad celular y fagocitosis, se requiere una reorganización de los microfilamentos que componen el citoesqueleto, constituidos principalmente por actina⁽²⁰⁵⁾.

En los experimentos destinados a estudiar el tipo de receptor de ET-1 que media estos efectos de la ET-1 sobre los neutrófilos no hemos obtenido resultados que permitan definir de forma expresa qué tipo de receptor de ET-1 expresan los neutrófilos. Existen estudios que demuestran que el receptor que existe en los monocitos y macrófagos es del tipo ET_A . Nuestros resultados, indican que el tipo mayoritario de receptor de ET-1 en el neutrófilo sería del tipo ET_A , ya que los efectos inducidos por la ET-1 en los neutrófilos se bloquearon mediante incubación de éstos con BQ-123, un antagonista selectivo de los receptores de tipo ET-A. Sin embargo no podemos descartar la existencia de receptor de tipo B de la ET-1 en los neutrófilos ya que también en alguno de los experimentos el antagonista del receptor B bloqueó el efecto de la ET-1; o en algunos de los casos al bloquear con BQ-123 el receptor A, la ET-1 produjo un efecto que debía estar mediado por el tipo B. Esta variabilidad de resultados puede ser debida a que los antagonistas disponibles no sean muy específicos para el tipo de receptores presente en los neutrófilos.

Recientemente se ha publicado un estudio en el que los autores concluyen que el tipo de receptor de ET-1 en los neutrófilos es del tipo ET_A , ya que un bolo intravenoso de ET-1 produce efectos inflamatorios y neutropenia que se bloquean mediante un antagonista selectivo de los receptores ET_A , FR 139317. El agonista selectivo del receptor ET_B , IRL 1620, también produjo neutropenia pero en menor medida que la ET-1⁽²⁰⁶⁾. Sin embargo, otros autores han estudiado el

papel de la ET-1 y la ET-3 en la quimiotaxis de los neutrófilos demostrando que éstos poseen los dos tipos de receptores, ET_A y ET_B ⁽²³³⁾.

Para clarificar de forma definitiva este aspecto, son necesarios más estudios en los que se deberán utilizar técnicas de biología molecular que faciliten la detección del tipo de receptor de ET-1 que se expresa en el neutrófilo. Por lo tanto, próximos experimentos que realizaremos en nuestro laboratorio intentarán analizar mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) o Western Blot, qué tipo de receptor o receptores de ET-1 se expresa en la superficie del neutrófilo. La caracterización del tipo/s de receptores de ET-1 en otras células puede ser de importancia para el abordaje farmacológico de situaciones como la isquemia/reperfusión, en los cuales la activación del neutrófilo juega un papel relevante.

2.- La L-arginina, precursor de la síntesis de NO, es capaz de inhibir el efecto de la ET-1 en los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ en los neutrófilos.

La presencia de L-arginina inhibió el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por ET-1. Sin embargo este efecto no fue selectivo para la activación de los neutrófilos por ET-1, ya que resultados similares se obtuvieron sobre el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ inducido por fMLP.

La ausencia de efecto de la D-arginina, no metabolizable, es una evidencia de la especificidad enantiomérica de la inhibición inducida por la L-arginina. Por otro lado, el antagonista de la L-arginina, L-NMMA pero no el NwNLA revirtió el efecto inhibitorio de la L-arginina. Esta diferencia en la especificidad de los inhibidores de la formación de NO puede indicar la existencia de diferentes tipos de NO sintasa en el neutrófilo con respecto a otras células, como ya han referido McCall y cols⁽¹⁵⁶⁾.

Los neutrófilos tienen la maquinaria enzimática necesaria para la producción de NO. McCall y cols demostraron que la producción de NO por los neutrófilos puede aumentarse estimulando a estas células con fMLP⁽¹⁵⁶⁾. Nuestros resultados demuestran que, en presencia del aminoácido dador de NO, L-arginina, algunas de las señales intracelulares inducidas por la ET-1 y el fMLP sobre la movilización de Ca^{2+} por los neutrófilos se inhiben. De este modo, la producción de NO mediada por la L-arginina, puede ser considerada como un mecanismo endógeno para controlar la acción de distintos mediadores que actúen sobre el neutrófilo. Así se conoce, por ejemplo, que el NO también inhibe la polimerización de actina inducida por el fMLP en neutrófilos en suspensión y adheridos, mediante la ADP-ribosilación del filamento de actina⁽²⁰⁷⁾.

3.- EL sistema NO/GMPc actúa mediante un mecanismo de retroregulación en la activación de los neutrófilos por ET-1.

Los resultados de este grupo de experimentos demostraron que: 1) la ET-1 y el fMLP inducen la formación de NO en el neutrófilo; esta inducción es dependiente de la disponibilidad de L-arginina en el interior de la célula; 2) la ET-1 y el fMLP inducen la formación de GMPc en los neutrófilos, mediante un sistema NO-dependiente; 3) el neutrófilo transporta L-arginina por un sistema parcialmente Na^+ dependiente; 4) el transporte de L-arginina en el neutrófilo no es estimulable por ET-1 o fMLP.

Como han demostrado distintos autores, los neutrófilos producen NO a partir de L-arginina^(156,78,164). Consecuencias funcionales de la producción de NO por los neutrófilos son: la antiagregabilidad plaquetaria, el efecto relajante de vasos cuyo endotelio está dañado^(164,208), y la inhibición de la adhesión de estas células a la pared vascular⁽¹⁰⁰⁾.

En nuestro estudio, postulamos la existencia de un papel autocrino del NO sobre el mismo neutrófilo. Nguyen y cols⁽²⁰⁹⁾ han demostrado un papel autocrino y autorregulador del NO en la plaqueta, mediante la elevación del GMPc. En este sentido, tanto la inhibición del aumento transitorio del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la L-arginina o el análogo estructural del GMPc, 8-Br-GMPc, y la elevación del GMPc inducido por la ET-1 o fMLP en neutrófilos incubados por L-arginina, apoyan la existencia de un mecanismo autorregulador mediado por el sistema L-arginina/NO/GMPc en los neutrófilos.

Una evidencia directa de la implicación de estos mecanismos se obtuvo con los experimentos que mostraron un aumento de L-citrulina en los neutrófilos estimulados con ET-1. Las células endoteliales vasculares y los macrófagos sintetizan L-citrulina y NO a partir de L-arginina^(65,66,82,210). En nuestro estudio, la generación de L-citrulina aumentó en neutrófilos preincubados con L-arginina y estimulados con ET-1 o fMLP, evidenciando a la vez una dependencia del nivel de sustrato.

La dependencia de L-arginina en el aumento de GMPc inducido por ET-1 y la reversión de este efecto por L-NMMA sugieren que el efecto de ET-1 y fMLP fue NO-dependiente. Nuestros hallazgos apoyan también la hipótesis de la implicación del sistema NO/GMPc, ya que resultados similares a los obtenidos con L-NMMA se observaron mediante la inhibición de la guanilato ciclasa soluble (enzima encargada de la generación de GMPc), por el empleo de azul de metileno. Se ha demostrado que la ET-1 estimula la producción de GMPc en células epiteliales

de riñón de cerdo, mediante un mecanismo dependiente de L-arginina-Guanilato Ciclasa soluble lo que estaría relacionado con el efecto natriurético de la ET-1 in vivo⁽²¹¹⁾.

Finalmente, analizamos el sistema de transporte de L-arginina en el neutrófilo con el fin de conocer si la mayor generación de L-citrulina mediante la incubación con ET-1 o fMLP se debía a una estimulación del transporte de L-arginina. Los sistemas de transporte de distintos aminoácidos en células relacionadas con los neutrófilos como células de leucemia mieloide y macrófagos^(212,213) están suficientemente caracterizados, pero no se tenían resultados específicos sobre el transporte de L-arginina en los neutrófilos.

Los aminoácidos catiónicos o básicos como L-arginina son transportados por distintas células mediante un transportador selectivo, llamado y^+ ⁽⁷⁰⁾. El sistema y^+ es un sistema de transporte independiente de Na^+ , pero en algunos casos, como en el borde en cepillo de membranas de origen renal o intestinal puede ser parcialmente Na^+ dependiente⁽⁷⁰⁾. La L-Lisina tiene un sistema de transporte similar en macrófagos^(214,215). A diferencia de lo observado en el neutrófilo, el transporte de L-arginina por el endotelio parece ser Na^+ -independiente⁽⁶⁹⁾. Distintos autores^(216,217) también han demostrado que el transportador de L-arginina por la célula endotelial es también del tipo y^+ . Este mismo transportador está implicado en la captación de otros aminoácidos catiónicos por el endotelio, como la L-Lisina⁽²¹⁸⁾.

La ET-1 solamente estimuló la captación de L-arginina en presencia de L-NMMA, y este efecto se revirtió por el análogo de GMPc, 8-Br-GMPc. Estos dos resultados sugieren que la ET-1 y el sistema NO/GMPc actúan sobre el sistema de transporte de L-arginina en los neutrófilos mediante un mecanismo de retroregulación. Para conocer el mecanismo preciso de estos efectos se requeriría el estudio y caracterización de los sitios de regulación del transportador de L-arginina en el neutrófilo.

El aminoácido L-arginina además de ser sustrato para la síntesis de NO tiene también un papel importante en la síntesis de las proteínas orgánicas y en el ciclo de la urea⁽⁶⁹⁾.

Normalmente la arginina se deriva de la dieta o de la citrulina, a través de diversas reacciones orgánicas⁽⁶⁹⁾. La citrulina absorbida por el intestino es pobremente utilizada por el hígado, siendo aprovechada extrahepáticamente por el riñón⁽⁶⁹⁾. Aproximadamente el 25% de la glutamina de origen intestinal es liberada en la circulación como citrulina. En el hígado, la arginina sintetizada desde citrulina es rápidamente catabolizada dado el alto contenido en arginasa, por lo que la liberación de arginina desde el hígado es mínima. Sin embargo, el riñón y el músculo tienen baja actividad de arginasa⁽²¹⁷⁾. Esta enzima también se encuentra en humanos, en

los eritrocitos, leucocitos y fibroblastos⁽²¹⁸⁾. Aunque los neutrófilos pueden metabolizar la L-arginina mediante la arginasa^(219,220), la inhibición de la generación de L-citrulina por el L-NMMA descarta el papel de la arginasa en el metabolismo de la L-arginina en el neutrófilo estimulado por ET-1.

Los resultados de esta tesis indican que la concentración intracelular de L-arginina es un factor limitante en la síntesis de NO en los neutrófilos. Los neutrófilos probablemente se deplecionan de L-arginina durante el proceso de aislamiento, y la incubación en presencia de L-arginina exógena repleciona los almacenes intracelulares de L-arginina. Distintos autores han demostrado la importancia de los niveles locales de L-arginina en células endoteliales y en macrófagos^(221,222,223,219). Nuestros resultados demuestran que cambios en la disponibilidad de L-arginina pueden inducir profundas consecuencias en la biología de los neutrófilos.

4.- La ET-1 activa la adhesión de neutrófilos al endotelio.

La función *in vivo* de la ET-1 no está todavía suficientemente definida. Diversos estudios han demostrado que los niveles de ET-1 circulantes se elevan en situaciones en las que la interacción entre los neutrófilos y el endotelio tiene una relevancia patogenética especial como por ejemplo en la isquemia miocárdica^(55,224,225). No obstante, no existen datos acerca de la posible relación entre los niveles elevados de ET-1 y los cambios inducidos en las propiedades del neutrófilo en estas situaciones, como por ejemplo la adhesividad.

Estos resultados pueden contribuir a la comprensión del papel real de la ET-1 en situaciones fisiopatológicas. Los resultados obtenidos demuestran que: a) la ET-1 activa la adhesión de neutrófilos al endotelio, actuando preferentemente sobre las células de la sangre, a través del aumento de expresión de integrinas; b) el aumento de la adhesión de neutrófilos al endotelio inducido por ET-1 se correlaciona con la acumulación de neutrófilos a corazón aislado; c) la infusión de ET-1 *in vivo* activa la adhesión de neutrófilos al corazón.

La ET-1 indujo la adhesión de neutrófilos al endotelio en una proporción similar a la que lo hizo un conocido péptido quimiotáctico, fMLP. Las concentraciones de ET-1 que estimularon la adhesión de los neutrófilos fueron mayores que los niveles que se encuentran en plasma; sin embargo, los niveles tisulares locales alcanzados durante los procesos de isquemia son probablemente mayores que los que podemos medir en las muestras de sangre periférica⁽²²⁵⁾.

Por todo esto, en situaciones patológicas probablemente la concentración local de ET-1 alcanzada puede estar en el rango de 10^{-9} M o mayor.

Para estudiar el mecanismo por el cual la ET-1 indujo la adhesión de los neutrófilos, analizamos la implicación de la glicoproteína de adhesión CD11/CD18. La adhesión inducida por la ET-1 se inhibió significativamente preincubando los neutrófilos con TS1/18, un anticuerpo monoclonal contra la cadena β común CD18 de éstas. Los estudios de citometría de flujo indican que la ET-1 activa la expresión en la superficie del neutrófilo del antígeno CD18 y la del antígeno CD11b, consolidando por lo tanto las evidencias obtenidas en los experimentos de adhesión, implicando esta familia de integrinas en la adhesión de los neutrófilos inducida por ET-1.

Agentes como el fMLP o el PMA inducen la expresión de integrinas sobre la superficie del neutrófilo⁽²²⁷⁾. Este aumento de la expresión de integrinas resulta de la movilización de proteínas preformadas desde los gránulos específicos localizados en el interior de la célula hasta la superficie de la misma. Utilizando anticuerpos monoclonales contra cada subunidad α particular observamos que las integrinas CD11a/CD18, CD11b/CD18 y CD11c/CD18 tienen una participación parcial pero significativa en la adhesión de los neutrófilos inducidos por ET-1. Específicamente, el anticuerpo contra el antígeno CD11b/CD18, Bear-1, parece ser el más eficiente como inhibidor de la adhesión. Este resultado concuerda con la mayor expresión de CD11b en la superficie del neutrófilo estimulado con ET-1 observada en los experimentos de citometría de flujo. Cuando se combinaron los tres anticuerpos contra las tres cadenas α se obtuvo igual inhibición que cuando se utilizó el anticuerpo contra la cadena β común CD18, lo que demuestra una interacción positiva de los tres miembros de la familia de las integrinas en el proceso de adhesión de los neutrófilos inducida por ET-1.

Los posibles ligandos de estas integrinas en la célula endotelial suelen estar basalmente expresados en la superficie endotelial, como son ICAM-1 e ICAM-2⁽¹²⁴⁾, por lo que su expresión no sería inducida por ET-1 como lo demuestran los experimentos en los que sólo la célula endotelial se incubó con ET-1. La ET-1 no tuvo efecto sobre el endotelio en el proceso de adhesión. Se ha demostrado también como el tromboxano A_2 induce la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular por un mecanismo similar al encontrado por nosotros para la ET-1⁽²²⁸⁾.

La adhesión de neutrófilos a la superficie plástica, la ausencia de efecto de ET-1 preincubada en la célula endotelial y la adhesión de neutrófilos humanos a células endoteliales humanas, mostraron que el efecto de la ET-1 fue predominantemente sobre el neutrófilo y que no existe efecto inespecífico debido a la heterogeneidad de especies. La especificidad del efecto

de la ET-1 como agente inductor de la adhesión se demostró también mediante los experimentos que mostraron la ausencia de efecto adhesivo de otros agentes vasoconstrictores como Ang II o AVP.

Distintos autores han implicado al NO en la anti-adhesividad del endotelio a las células sanguíneas. Los grupos de Salvador Moncada⁽²⁾ y de John Vane⁽²²⁹⁾ describieron como plaquetas estimuladas por trombina tenían una menor adhesión al endotelio cuando se añadía al medio NO o SOD, aumentando la adhesión en presencia de hemoglobina, secuestrante del NO naciente. Recientemente Granger y cols han demostrado que el NO tiene un papel inhibitor de la adhesión de los neutrófilos al endotelio⁽¹⁰⁰⁾. En este sentido, los resultados encontrados por nosotros sobre la capacidad de inhibición del NO en la activación de los neutrófilos inducida por ET-1 pueden englobarse en esta misma línea.

Los hallazgos observados en el corazón aislado y perfundido y en las infusiones intra-atriales *in vivo* de ET-1 y la adhesión de neutrófilos en arterias aisladas, permiten hipotetizar sobre la potencial importancia fisiopatológica de los mismos. En nuestros resultados observamos que la ET-1 estimuló la acumulación de neutrófilos en el corazón por un mecanismo específico mediado por integrinas. La adhesión de neutrófilos al endotelio es de importancia crítica en el daño hipóxico a distintos órganos particularmente en el infarto de miocardio y en la isquemia renal. Ambos, la adhesión de los neutrófilos y el incremento de ET-1 circulante ocurre simultáneamente durante el proceso de isquemia-reperfusión renal o miocárdica. Nuestros resultados permiten, por el momento, asumir que la secuencia fisiopatológica más probable sería: Isquemia---Daño endotelial---Producción local de ET-1---activación local y parcial de neutrófilos en la zona de producción de ET-1---activación o aumento de expresión de integrinas---adhesión neutrofflica---aumento máximo de la activación neutrofflica y liberación enzimática.

Los resultados obtenidos en arterias aisladas en los que se vió como la ET-1, mediante un mecanismo inhibible por anticuerpos contra el antígeno CD18, induce la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular, apoyan la hipótesis de que los fenómenos de acumulación de neutrófilos a corazón tras la infusión de ET-1, corresponden a adhesión de los mismos sobre las superficies vasculares.

Desde hace ya varias décadas se ha venido implicando a distintos factores quimiotácticos en el proceso de la diapédesis de los leucocitos. *In vivo*, los factores quimiotácticos administrados por vía intravascular inducen una profunda neutropenia con secuestro de neutrófilos en la microvasculatura, posiblemente como resultado de un aumento en la interacción entre los

neutrófilos y el endotelio. Sin embargo, como ya hemos indicado anteriormente se sigue sin conocer cual es el verdadero papel fisiológico y fisiopatológico de la ET-1. El hecho de que la administración local de ET-1 provoque una isquemia de los miembros inferiores que se acompaña de una neutropenia significativa, puede tener relevancia fisiopatológica. En este sentido, existen diversas líneas de evidencia que han implicado a la ET-1 en el mantenimiento del fracaso renal postisquémico^(230,37), pero hasta la fecha no se le había implicado en el daño endotelial inducido por la adhesión de neutrófilos en el proceso de isquemia-reperfusión. En los experimentos realizados *in vivo* se halló una elevada actividad mieloperoxidasa en los corazones infundidos con ET-1 indicando una mayor acumulación de neutrófilos en este órgano, lo que apoya la hipótesis que la ET-1 que se eleva en situaciones como la isquemia miocárdica, puede tener una importancia clave en la interacción de los neutrófilos con el miocardio^(55,224,225). Esta hipótesis crearía la posibilidad de nuevos abordajes farmacológicos al infarto de miocardio y a las situaciones de hipocontractilidad ligadas al "stunning" ("aturdimiento") así como de la isquemia de diversos órganos. Por añadidura, estos hallazgos redoblarían el interés por conocer con mayor exactitud las implicaciones de los niveles de ET-1 en las distintas formas de isquemia, para poder relacionarlas con el nivel de acumulación de neutrófilos y a su vez con el pronóstico de las lesiones.

VI. Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La ET-1 es capaz de inducir activación de los neutrófilos, que se observa en:
 - Incremento en la $[Ca^{2+}]_i$
 - Polimerización de los filamentos de actina
 - Liberación de β -Glucuronidasa

2. Estos efectos parecen estar mediados en forma significativa por el receptor de ET-1 de tipo A, pero algunos datos sugieren la posible existencia del receptor de tipo B.

3. El efecto de la ET-1 en el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ es inhibido por L-arginina y GMPC, lo que sugiere un mecanismo de retroregulación negativo mediado por NO.

4. El efecto inhibitorio de la L-arginina sobre el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 está mediado por la formación de NO.

5. La ET-1 induce el metabolismo de L-arginina a L-citrulina, activando la formación de NO y como consecuencia, de GMPC, a través de un mecanismo dependiente de la disponibilidad de L-arginina.

6. Los neutrófilos poseen un sistema de transporte de L-arginina con dos componentes, uno dependiente de Na^+ y otro independiente.

7. En condiciones basales, el transporte de L-arginina en los neutrófilos no se estimula por ET-1. Sin embargo, este transporte se activa por ET-1 en presencia de un antagonista de la síntesis de NO, L-NMMA, revirtiéndose este efecto por 8-Br-GMPC. Estos resultados, sugieren que la ET-1 y el NO/GMPC interaccionan mediante un mecanismo de retroregulación negativo.

8. La ET-1 induce la adhesión de neutrófilos a células endoteliales mediante un mecanismo en el que está implicada la expresión de moléculas de adhesión, de la familia β_2 -integrinas, en la superficie del neutrófilo.

9. La ET-1 estimula la acumulación de neutrófilos en el corazón in vitro e in vivo. Este acúmulo queda bloqueado por anticuerpos dirigidos contra las β_2 -integrinas.

10. Estos hallazgos desempeñan un papel preponderante en los procesos fisiopatológicos en los que se encuentran niveles elevados de ET-1 en plasma, como por ejemplo la isquemia-reperusión de diversos órganos.

VII. Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Marsden P.A.; Goligorsky M.S.; Brenner B.M.: Endothelial cell biology in relation to current concepts of vessel wall structure and function. *J Am Soc Nephrol* 1991;1:931-948.
- 2.- Radomski M.W.; Palmer R.M.J.; Moncada S.: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2:1057-1058.
- 3.- Jaffe E.A.: Physiologic functions of normal endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1985;454:279-291.
- 4.- Yanagisawa M.; Kurihara H.; Kimura Y.; Tomomoba Y.; Kobayashi M.; Mitsui Y.; Yazaki Y.; Goto K.; Masaki T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.
- 5.- Inoue A.; Yanagisawa M.; Takawa Y.; Mitsui Y.; Kobayashi M.; Masaki T.: The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct iso-peptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2863-2867.
- 6.- Kloog Y.; Sokolovsky M.: Similarities in mode and sites of action of sarafatoxins and endothelin. *Trends in Pharmacological Science* 1989;10:212-214.
- 7.- Sessa W.C.; Kaw S.; Hecker M.; Vane J.R.: The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:613-618.
- 8.- Itoh Y.; Yanagisawa M.; Ohkubo S.; Kimura C.; Kosaka T.; Inoue A.; Ishida N.; Mitsui Y.; Onda H.; Fujino M.; Masaki T.: Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin; identity of human and porcine endothelin. *FEBS lett* 1988;231:440-444.
- 9.- Yanagisawa M.; Inoue A.; Ishikawa T.; Kasuya Y.; Kimura S.; Kumagaye S.; Nakajima K.; Watanabe T.; Sakakibara S.; Goto K.; Masaki T.: Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:6964-6967.
- 10.- Ritz M.F.; Stuenkel E.L.; Dayanithi G.; Jones R.; Nordmann J.J.: Endothelin regulation of neuropeptide release from nerve endings of the posterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:8371-8375.
- 11.- Lüscher T.; Oemar B.O.; Boulanger C.M.; Hahn A.W.A.: Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors. *J Hypertension* 1993;11:7-11.
- 12.- Sokolovsky M.: BQ-123 identifies heterogeneity and allosteric interactions at the rat heart endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:32-38.
- 13.- Hltara Y.; Yoshimi H.; Emori T.; Shichiri M.; Marumo F.; Watanabe T.X.; Kumagaye S.; Nakajima K.; Kimura T.; Sakakibara S.: Receptor binding activity and cytosolic free

- calcium response by synthetic endothelin analogs in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:228-234.
- 14.- Kimura S.; Kasuya Y.; Sawamura T.; Shimui O.; Sugita Y.; Yanagisawa M.; Goto K.; Masaki T.: Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;156:1182-1186.
 - 15.- Van Renterghem C.; Vigne P.; Barhanin J.; Schmid-Alliana A.; Frelin C.; Lazdunski M.: Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:988-983.
 - 16.- Ihara M.; Saeki T.; Furukoda T.; Saeki T.; Kimura S.; Ozaki S.; Patel A.C.; Yano M.A.: A novel radioligand [¹²⁵I]BQ-3020 selective for endothelin (ETB) receptors. *Life Sci* 1992;51:PL47-52.
 - 17.- Urade Y.; Fujitani Y.; Oda K.; Watakabe T.; Unemura I.; Takai M.; Okada T.; Sakata K.; Karak H.: An endothelin B receptor-selective antagonist IRL-1038, [Cys 11-Cys 15]-endothelin-1 (11-21). *Febs Lett* 1992;Oct 12 311(1):12-6.
 - 18.- Wakimasu M.; kikuchi T.; Kubo T.; Asami T.; Ohtaki T.; Fujino M.: Studies on endothelin antagonist. In *Perspectives in Medicinal Chemistry*, ed by B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer, R. Giger, Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, Switzerland, 1993;165-177.
 - 19.- Aramori I.; Nirei H.; Shoubo M.; Sogaba K.; Nakamura K.; Kojo H.; Notsu Y.; Ono T.; Nakanishi S.: Subtype selectivity of a novel endothelin antagonist, FR 139317, for the two endothelin receptors in transfected chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 1993; Feb 43(2):127-31.
 - 20.- Doherty AM.; Cody WL.; He-JX.; DePue PL.; Cheng XM.; Welch KM.; Flynn MA.; Reynolds EE.; LaDouceur DM.; Davis LS.: In vitro and in vivo studies with a series of hexapeptide endothelin antagonists. *J Cardiovascular Pharmacol* 1993; 22 Suppl 8:S98-102.
 - 21.- Fujimoto M.; Mihara S.; Nakajima S.; Veda M.; Nakamura M.; Sakurai K.: A novel non-peptide endothelin antagonist isolated from bayberry, *Myrica cerifera*. *Febs Lett* 1992;Jun 22;305(1):41-44.
 - 22.- Breu V.; Loffler BM.; Clozel M.: In vitro characterization of Ro 46-2005, a novel synthetic non peptide endothelin antagonist of ET_A and ET_B receptors. *Febs Lett* 1993;Nov 15; 334(2):210-14.
 - 23.- Kitada C.; Ohtaki T.; Masuda Y.; Masuo M.; Nomura H.; Asami T.; Matsumoto Y.; Satou M.; Fujimo M.: Design and synthesis of ET_A receptor antagonists and study of ET_A receptor distribution. *J Cardiovascular Pharmacol* 1993;22 Suppl 8:S128-31.
 - 24.- Sakurai T.; Yanagisawa M.; Masaki T.: Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13,1:3-108.

- 25.- Warner T.D.; Mitchell J.A.; DeNucci G.; Vane J.R.: *J Cardiovascular Pharmacol* 1989;13(suppl 5,S85-S88).
- 26.- Katwa L.C.; Guarda E.; Weber K.T.: Endothelin receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993;Dec 27(12):2125-9.
- 27.- Kowala M.C.; Rose P.M.; Stein P.D.; Golder N.; Recce R.; Beyer S.; Valentine M.; Barton D.; Durhan S.K.: Selective blockade of the endothelin subtype A receptor decreases early atherosclerosis in hamster fed cholesterol. *Am J Pathol* 1995;Apr 146(4):819-26.
- 28.- Takuwa N.; Takuwa Y.; Yanagisawa M.; Yamashita K.; Masaki T.: A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in swiss 373 fibroblasts. *J Biol Chem* 1989;264:7856-7861.
- 29.- Guarda E.; Katura L.C.; Myers P.R.; Tyagi S.C.; Weber K.T.: Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1993;Dec 27:2130-4.
- 30.- Sakamoto A.; Yamagisawa M.; Sawamura T.; Enoki T.; Sakurai T.; Nakao K.; Toyooka T.; Masaki T.: Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin A-selective antagonist and endothelin A-selective antagonist and endothelin B-selective agonist. *J Biol Chem* 1993;268:8547-8553.
- 31.- Rasmussen H.: The calcium messenger system. *N Engl J Med.* 1986;314:1094-1100.
- 32.- Smith J.B.; Smith L.; Brown E.R.; Barnes D.; Sabir M.A.; Davis J.S.; Farese R.V.: Angiotensin II rapidly increases phosphatidate-phosphoinositide hydrolysis and mobilizes intracellular calcium in cultured arterial muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:7812-7816.
- 33.- Caramelo C.; Tsai P.; Schrier R.W.: Mechanism of cellular effect of phorbol esters on action of arginine vasopressin and angiotensin II on rat vascular smooth muscle cells in culture. *Biochem J* 1988;254:625-629.
- 34.- Marsden P.A.; Danthuhuri N.R.; Brenner B.M.; Ballermann B.J.; Brock T.A.: Endothelin action on vascular smooth muscle involves inositol triphosphate and calcium mobilization. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;158:86-96.
- 35.- Resink T.J.; Scott-Burden T.; Bühler F.R.: Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:1360-1368.
- 36.- McNulty E.E.; Plevin R.; Wakelan N.J.: Stimulation of the hydrolysis of phosphatidylcholine by endothelin, a complete mitogen for Rat-1 fibroblasts. *Biochem J* 1990;272:761-766.
- 37.- López Farré A.; Gómez Garre D.; Bernabeu F.; Montañés I.; Millás I.; López Novoa J.M.: Renal effects and mesangial cell contraction induced by endothelin are mediated by

- PAF. *Kidney Int* 1991;39:624-630.
- 38.- Simonson M.S.; Wann S.; Mené P.; Dubyak G.; Kester M.; Nakazato Y.; Sedor J.R.; Dunn M.J.: Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, C-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1989;83:708-712.
- 39.- Rosati C.; Jeanclos E.; Cavalier S.; Chabrier P.E.; Hannaert P.; Braquet P.; Garay R.: Stimulatory action of endothelin-1 on membrane Na⁺ transport in vascular smooth muscle cells in culture. *Am J Hypertens* 1990;3:711-713.
- 40.- Van Renterghem C.; Vigne P.; Barhanin J.; Schmid-Alliana A.; Frelin C.; Lazdunski M.: Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:988-983.
- 41.- Hitara Y.; Yoshimi H.; Takata S.; Watanabe T.; Kumagai S.; Nakajima K.; Sakakibara S.: Cellular mechanism of action by a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;154:868-875.
- 42.- López-Farré A.; Montañés I.; Millás I.; López-Novoa J.M.: Effect of endothelin on renal function. *Eur J Pharmacol* 1989;163:187-190.
- 43.- Wright C.E.; Forzard J.R.: Regional vasodilation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anesthetized spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharm* 1988;155:201-203.
- 44.- Lipton H.; Goff J.; Hyman A: Effects of endothelin in the systemic and renal vascular beds in vivo. *Eur J Pharmacol* 1988;155:197-199.
- 45.- De Nucci G.D.; Thomas R.; D'Orleans-Juste P.: Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9797-9800.
- 46.- Rees D.D.; Palmer R.M.J.; Hodson H.F.: A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 1989;96:418-424.
- 47.- Rees D.D.; Palmer R.M.J.; Moncada S.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3375-3378.
- 48.- Kurihara Y.; Kurihara H.; Suzuki; et al.: Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in ET-1. *Nature* 1994;368:703-710.
- 49.- Lüscher T.F.; Boulanger C.M.; Dohi Y.; Yang Z.: Endothelium-derived contracting factors (Brief review). *Hypertension* 1992;19:117-30.
- 50.- Boulanger C.; Lüscher T.F.: Release of endothelin from the porcine aorta: Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990;85:587-90.

- 51.- Saijonmaa O.; Ristimaki A.; Fyhrquist F.: Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:514-20.
- 52.- Yokokawa K.; Kohno M.; Yasunari K.; Murukawa K.; Horio T.; Takada T.: Endothelin-3 regulates endothelin-1 production in cultured human endothelial cells. *Hypertension* 1991;18:304-15.
- 53.- Stewart D.J.; Laugleben D.; Cernacek P.; Cianflone K.: Endothelin release is inhibited by coculture of endothelial cells with cells of vascular media. *Am J Physiol* 1990;259:H1928-32.
- 54.- Miller R.C.; Pelton J.T.; Huggins J.P.: Endothelins: from receptors to medicine. *TIPS* 1993;14:54-60.
- 55.- Margulies K.R.; Hildebrand Jr.F.I.; Lerman A.; Perella M.A.; Burnett J.C.Jr.: Increased endothelin in experimental heart failure. *Circulation* 1990;82:2226-2230.
- 56.- Cody R.J.; Haas G.J.; Capers Q.: Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 1992;85:504-509.
- 57.- Tomoda H.: Plasma endothelin in acute myocardial infarction with heart failure. *Am Heart J* 1993;125:667-672.
- 58.- Yorikane R.; Shiga H.; Miyake S.: Evidence for direct arrhythmogenic action of endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:457-462.
- 59.- Rampport M.; Williams T.J.: Polymorphonuclear leukocyte-dependent plasma leakage in rabbit skin by prostacyclin, depending on the route of administration. *Am J Pathol* 1986;124:66-73.
- 60.- Furchgott R.F.; Zawadzki J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
- 61.- Cocks T.M.; Angus J.A.; Campbell J.M.; Campbell G.R.: Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. *J Cell Physiol* 1989;28:45-51.
- 62.- Ignarro L.J.; Buga G.M.; Wood K.S.; Byrns R.E.; Chandhuri G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Nat Acad Sci* 1987;84:9265-9269.
- 63.- Barbul A.: Physiology and pharmacology of arginine. In: Moncada S.; Higgs E.A.: Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), 1990;317-329.
- 64.- Myers P.R.; Minor R.L.; Gerra R.; Bates J.N.; Harrison D.G.: Vasorelaxant properties

- of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990;345:161-163.
- 65.- Palmer R.M.J.; Ashton D.S.; Moncada S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-666.
- 66.- Palmer R.M.J.; Ferrige A.G.; Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-525.
- 67.- Boje K.M.; Fung H.L.: Endothelial nitric oxide generating enzymes(s) in the bovine aorta: subcellular location and metabolic characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:20-26.
- 68.- Kwon N.S.; Nathan C.F.; Gilker C.; Griffeth O.W.; Mathews D.E.; Steuhr D.: L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase, the ureido oxygen derivates from dioxygen. *J Biol Chem* 1990;265:13442-13445.
- 69.- Cynober L.; Le Boucher J.; Vasson M.P.: Arginine metabolism in mammals. *Nutr Biochem* 1995;6:402-413.
- 70.- White, M.F.: The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1985;822:355-374.
- 71.- Amezcua J.L.; de Souza B.M.; Palmer R.M.J.; Moncada S.: Inhibition of nitric oxide synthesis inhibits endothelium-dependent vasodilation in the rabbit isolated heart. *Br J Pharmacol* 1989;96:105P.
- 72.- Lahera V.; Fernández-Tresguerres J.A.: Factor endotelial relajante (EDRF): ¿Un nuevo concepto de la regulación vascular endocrina? *Endocrinología (Spn)* 1990;37:340-343.
- 73.- Bulkley G.B.: Pathophysiology of free radical-mediated reperfusion injury. *J Vasc Surgery* 1987;5:512-517.
- 74.- McCord J.M.; Fridovich I.: The reduction of cytochrome c by milk xantine oxidase *J Biol Chem* 1968;243:5753-5760.
- 75.- Pou S.; Pou W.S.; Bredt D.S.; Snyder S.H.; Rosen G.M.: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992;267:24173-24176.
- 76.- Marsden P.A.; Brenner B.M.: Nitric oxide and endothelins: Novel autocrine/paracrine regulators of the circulation. *Semin Nephrol* 1991;11:169-185.
- 77.- Stuehr D.J.; Gross S.S.; Sakuma I.; Levi R.; Nathan C.F.: Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of EDRF and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* 1989;160:813-819.
- 78.- Wright C.D.; Mulsch A.; Busse R.; Osswald H.: Generation of nitric oxide by human

- neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1989;160:813-819.
- 79.- Radomski M.W.; Palmer R.M.J.; Moncada S.: Characterization of the L-arginine nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990;101:325-328.
- 80.- Yui Y.; Hattori R.; Kosuga K.; Elizawa H.; Hiki K.; Ohkawa S.; Ohnishi K.; Terao S.; Kawai C.: Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 1991;226:3369-3371. (comprobar páginas)
- 81.- Liang Y.; William R.V.; Suffredini A.F.; Danner R.L.: Human Polymorphonuclear Leukocytes lack detectable nitric oxide synthase activity. *The Journal of Immunology* 1994;153:1825-1834.
- 82.- Hibbs J.B.; Taintor R.R.; Vavrin Z.; Rachlin E.M.: Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:87-94.
- 83.- Knowles R.S.; Palacios M.; Palmer R.M.J.; Moncada S.: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transducer mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5159-5162.
- 84.- Moncada S.; Palmer R.M.J.; Higgs E.A.: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-141.
- 85.- Raij L.; Baylis C.: Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int* 1995;48:20-32.
- 86.- Busse R.; Mülsch A.: Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1990;275:87-90.
- 87.- Kilbourn R.G.; Bellone I.: Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:772-776.
- 88.- Murad F.: Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. *J Clin Invest* 1986;78:1-5.
- 89.- Thompson D.K.; Garbers D.L.: Guanylyl cyclase in cell signalling. *Curr Op Cell Biol* 1990;2:206-211.
- 90.- Ney P.; Schroeder H.; Schror K.: Nitrovasodilator-induced inhibition of LTB₄ release from human PMN may be mediated by cyclic GMP. *Eicosanoides* 1990;3:243.
- 91.- Olivera A.; Pérez-Rodrigo P.; López-Farré A.; Montañés I.; López-Novoa J.M.: Papel del endotelio en la regulación de la contracción del músculo liso vascular. *Hipertensión (Esp)* 1990;6:461-472.
- 92.- Brenner B.M.; Troy J.; Ballermann B.J.: Endothelium-dependent vascular responses: Mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 1989;84:1373-1378.

- 93.- Cernadas M.R.; Riesco A.; Gallego M.J.; Grandes S.; López-Farré A.; Casado S.; Hernando L.; Caramelo C.: L-arginine-induced hypotension. *Lancet* 1991;336:1017.
- 94.- Billiar T.R.; Curran R.D.; Stuehr D.J.; West M.A.; Bentz B.G.; Simmons R.L.: An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med* 1989;169:1467-1472.
- 95.- Moncada S.; Palmer R.M.J.; Higgs A.E.: The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilatador. *Hypertension* 1988;12:365-372.
- 96.- Vallance P.; Collier J.; Moncada S.: Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovascl Res* 1989;23:1053-1057.
- 97.- Vane J.R.; Anggard E.E.; Botting R.M.: Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323:27-36.
- 98.- Thiemermann C.; Vane J.: Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 1990;182:591-595.
- 99.- Kilbourn R.G.; Gross S.S.; Jubran A.; Adams J.; Griffith O.W.; Levi R.; Lodato R.: N^G-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Acad Nat Sci USA* 1990;87:3629-3632.
- 100.- Kubes P.; Suzuki M.; Granger D.N.: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Acad Nat Sci USA* 1991;88:4651-4655.
- 101.- Nakaki T.; Nakayama M.; Kato M.R.: Inhibition of nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1988;347-353.
- 102.- Kolpakov V.; Gordon D.; Kulik T.J.: Nitric oxide generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995;76:305-309.
- 103.- Pellipatta F.; Radaelli A.; Ferrero E.; Torinelli E.; Vidal M.J.; Chierchia S.L.; Zocchi M.R.: Inducible nitric oxide synthase modulates fibronectin production in the EA.hy926 Cell line and cultured human umbilical vein endothelial cells. *J of cardiovasc Pharmacol* 1994;24:1014-1019.
- 104.- Sklar L.A.; Bokoch G.M.; Button D.; Smolen J.E.: Regulation of ligand-receptor dynamics by guanine nucleotides. Real-time analysis of interconverting states for the neutrophil formyl peptide receptor. *J Biol Chem* 1987;262:135.
- 105.- Hyslop P.A.; Oades Z.A.; Jesaitis A.J.; Painter R.G.; Cochrane C.G.; Sklar L.A.: Evidence for N-formyl chemotactic peptide stimulated GTPase activity in human neutrophil homogenates. *FEBS Lett* 1984;166:165-69.

- 106.- Becker E.L.; Kermode J.C.; Naccache P.H.; Yassin R.; Munoz J.J.; et al.: Pertussis Toxin as a probe of neutrophil activation. *Fed Proc* 1986;45:2151-55.
- 107.- Bokoch G.M.; Gilman A.G.: Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell* 1984;39:301.
- 108.- Lu D.J.; Grinstein S.: ATP and guanine nucleotide dependence of neutrophil activation. Evidence for the involvement of two distinct GTP-binding proteins. *J Biol Chem* 1990;265:13721.
- 109.- Kranse K.H.; Lew P.D.: Calciosomes: Evidence for a new type of organelle regulating intracellular Ca^{2+} in phagocytes (abstract). *Clin Res* 1987;35:480A.
- 110.- Helfman D.M.; Applebaun B.D.; Volper W.R.; Kno J.F.: Phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase and its substrates in human neutrophils. *Biochem J* 1990;269:723.
- 111.- Stasia M.J.; Strulovia B.; Daniel-Issakani S.; et al: Immunocharacterization of B- and C-subspecies of protein kinase C in bovine neutrophils. *FEBS lett* 1990;274:61.
- 112.- Wright C.D.; Hoffman M.D.: The protein kinase C inhibitors H-7 and H-9 fail to inhibit human neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;135:749.
- 113.- Andrews P.C.; Babor B.M.: Endogenous protein phosphorylation by resting and activated human neutrophils. *Blood* 1983;61:333.
- 114.- Franson R.; Weiss J.; Martin L.: Phospholipase A_2 activity associated with the membranes of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem J* 1977;167:839.
- 115.- Walsh C.E.; Waite M.B.; Thomas M.J.; DeChatelet L.R.: Release and metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J Biol Chem* 1981;256:7228.
- 116.- Perianin A.; Snyderman R.: Analysis of calcium homeostasis in activated human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for two distinct mechanisms for lowering cytosolic calcium. *J Biol Chem* 1989;264:1005.
- 117.- Ozaki Y.; Kume S.: Functional responses of aequorin-loaded human neutrophils. Comparison with fura-2 loaded cells. *Biochim Biophys Acta* 1988;972:113.
- 118.- Lew P.D.; Monod A.; Krause K.H.; Waldvogel F.A.; Biden T.J.; Shlegel W.; The role of cytosolic free calcium in the generation of inositol 1,4,5 triphosphate and inositol 1,3,4 triphosphate in HL60 cells.: differential effects of chemotactic peptide receptor stimulation at distinct Ca^{2+} levels. *J Biol Chem* 1986;261(28):3121-27.
- 119.- Von Tscharner V.; Prod'hom B.; Baggiolini M.; Renter H.: Ion channels in human neutrophils activated by a raise in free cytosolic calcium concentration. *Nature* 1986;324:369-72.

- 120.- Pozzan T.; Lew D.P.; Wolheim C.B.; Tsein R.Y.: Is cytosolic ionized calcium regulating neutrophil activation? *Science* 1983;221:1413.
- 121.- Howard T.; Chaponnier C.; Yin H.; Stossel T.; Gelsolin-actin interaction and actin polymerization in human neutrophils. *J Cell Biol* 1990;110:1983.
- 122.- Henrick P.A.J.; Van der Tol M.E.; Verhoef J.: Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis of bacteria. *Immunology* 1984;52:671.
- 123.- Mrowietz U.; Schroder J.M.; Brasch J.; Christopher E.: Infiltrating neutrophils differ from circulating neutrophils when stimulated with C5a, NAP-1 / IL-8, LTB4 and FMLP. *Scand J Immunol* 1992;35:71.
- 124.- Sánchez-Madrid F.; Corbí A.L.: Leukocyte integrins: Structure, function and regulation of their activite. *Sem Cell Biol* 1992;3:402/1-402/12.
- 125.- Alvarez V.; Pulido R.; Campanero M.R.; Paraiso V.; Landázuri M.O.; Sánchez-Madrid F.: Differentially regulated cell surface expression of leukocyte adhesion receptors on neutrophils. *Kidney Int* 1991;40:899-905.
- 126.- Kishimoto T.K.; Jutila M.A.; Berg E.L.; Butcher E.C.: Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989;245:1238-1241.
- 127.- Lampugnani M.G.; Restani M.; Dejana E.; Marchisio P.C.: The role of integrins in the maintenance of endothelial monolayer integrity. *J Cell Biol* 1991;112:479-490.
- 128.- Ryan G.B.; Majno G.: Acute Inflammation. *Am J Pathol* 1977;86:183-276.
- 129.- Butcher E.C.: Cellular and Molecular mechanisms that direct leukocyte traffic. *Am J Pathol* 1990;136:3-11.
- 130.- Anner H.; Kaufman R.P. Jr.; Kobzik L.; Valeri R.; Shepro D.; Hechtman H.B.: Pulmonary leukosequestration induced by hind limb ischemia. *Ann Surgery* 1987;206:162-167.
- 131.- Smith E.F.; Egau J.W.; Bugelski P.J.; Hillegass M.L.; Hill D.E.; Grisswold D.E.: Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255:H1060-h1068.
- 132.- Hernandez L.A.; Grisham M.B.; Twohig B.; Arfors K.E.; Harlan J.M.; Granger D.N.: Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987;253:H699-H703.
- 133.- Simpson P.J.; Todd R.F.; Fantone J.C.; Mickelson J.K.; Griffin J.D.; Lucchesi B.R.: Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (Anti Mo-1, Anti CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J Clin Invest* 1988;81:624-629.
- 134.- Vedder N.B.; Winn R.K.; Rice C.L.; Chi Y.; Arfors K.E.; Harlan J.M.: Amonoclonal

- antibody to the adherence-promoting leukocyte glycoprotein, CD18 reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. *J Clin Invest* 1988;81:939-944.
- 135.- Weisfeldt M.L.: Reperfusion and reperfusion injury. *Clin Res* 1987;35:13-20.
- 136.- Hattori R.; Hamilton K.K.; Fugate R.D.; McEver R.; Sims P.J.: Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intra-cellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 1989;264:7768-7771.
- 137.- Geng J.C.; Bevilacqua M.P.; Moore K.L.; McIntyre T.M.; Prescott S.M.; Kim J.M.; Bliss G.A.; Zimmerman G.A.; McEver R.P.: Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990;343:757-760.
- 138.- Brady H.R.; Persson U.; Ballermann B.J.; Brenner B.M.; Serhan C.N.: Leukotrienes stimulate neutrophil adhesion to mesangial cells: modulation with lipoxins. *Am J Physiol* 1990;F809-F815.
- 139.- Richter J.; Ng-Sikorski J.; Olsson I.; Andersson T.: Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human neutrophils is dependent on CD11b/CD18-integrin-triggered oscillations of cytosolic Ca^{2+} . *Cell Biol* 1990;87:9472-9476.
- 140.- Stoolman L.M.: Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 1989;56:907-910.
- 141.- Zimmermann G.A.; Prescott S.M.; McIntyre T.M.: Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *J Immunol Today* 1992;13:93-99.
- 142.- Shappell S.B.; Toman C.; Anderson D.C.; Taylor A.A.; Entman M.L.; Smith C.W.: Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *J Immunol* 1990;144:2702-2711.
- 143.- Ng-Sikorski J.; Andersson R.; Patarroyo M.; Andersson T.: Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Exp Cell Res* 1991;195:504-508.
- 144.- Stauton D.E.; Dustin M.L.; Springer T.A.: Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989;339:61-64.
- 145.- Rossengren S.; Olofsson A.M.; Von Andrian U.H.; Lundgrenakerlund E.; Arfors K.: Leukotriene B_4 -induced neutrophil mediated endothelial leakage in vitro and in vivo. *J Appl Physiol* 1991;71:1322-133.
- 146.- DeLisser H.M.; Newman P.J.; Albelda S.M.: Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). In current topics Microbiology and Immunology vol 184, leukocyte Homing and Differentiation (Dunon D.; Mackay C.R.; Imhof B.A. eds). Springer-Verlag, Heidelberg 1993:37-45.

- 147.- Tanaka Y.; Albelda S.M.; Horgan K.J.; Van Seventer G.A.; Shimizu Y.; Newman W.; Hallan J.; Newman P.J.; Buck G.A.; Shaw S.: CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of β_1 -integrin-mediated adhesion. *J Exp Med* 1992;176:245-253
- 148.- Bell D.; Jackson M.; Nicoll J.J.; Millar A.; Dawes J.; Muir A.L.: Inflammatory response, neutrophil activation, and free radical production after acute myocardial infarction, effect of thrombolytic treatment. *Br Heart J* 1990;63:822-828.
- 149.- Dimerman J.; Mehta J.; Mehta P.; Saldeen T.; Lawson D.; Donnelley W.: Neutrophil function in ischemic heart disease (abstr). *J Am Coll Cardiol* 1989;13:12:44A.
- 150.- Weksler B.B.; Platelets I.; Gallin J.I.; Godstein I.M.; Snyderman R.; eds: Inflammation: Basic principle and clinical correlates. New York. *Raven Press* 1988;543:57
- 151.- Anderson D.C.; Miller L.J.; Schmalstieg F.C.: Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: Structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. *J Immunol* 1986;137:15.
- 152.- Weiss S.J.: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365.
- 153.- Rimele T.J.; Sturm R.J.; Adams I.M.; Henry D.E.; Heaslip R.J.; Weichman B.M.; Grimes D.: Interactions of neutrophils with vascular smooth muscle cells: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;245:102-111.
- 154.- Lee D.K.H.; Faunce D.; Henry D.; Sturm R.; Rimele T.: Rat polymorphonuclear leukocytes (PMN) increase cGMP levels in rat aorta. *Faseb J.* 2: A518, 1988
- 155.- Harrison M.J.G.; Emmons P.R.; Mitchell J.R.: The effect of white cells on platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh* 1966;16:105-221.
- 156.- McCall T.B.; Boughton-Smith N.K.; Palmer R.M.J.; Whittle B.J.R.; Moncada S.: Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 1989;261:293-296.
- 157.- McCall T.B.; Palmer R.M.J.; Moncada S.: Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol* 1991.
- 158.- Schmidt H.H.H.W.; Seifert R.; Bohme E.: Formation and release of nitric oxide from human neutrophil and HL-60 cells induced by chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B₄. *Febs Lett.* 1989;244:357-360.
- 159.- Rees D.D.; Palmer R.M.J.; Schulz R.; Hodson H.F.; Moncada S.: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* e *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1990;101:746-752.
- 160.- McCall T.; Palmer R.M.J.; Boughton-Smith N.K.; Whittle B.J.R.; Moncada S.: The L-arginine: nitric oxide pathway in neutrophils. *In Nitric oxide from L-arginine: A*

- bioregulatory system, ed by S. Moncada and E.A. Higgs, pp. 257-265, Elsevier, Amsterdam, 1990.
- 161.- McCall T.B.; Feellisch M.; Palmer R.M.J.; Moncada S.: Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. *Br J Pharmacol* 1991;102:234-238.
- 162.- Brenner B.M.; Troy J.L.; Ballerman B.J.: Endothelium- dependent vascular responses. *J Clin Invest* 1989;84:1373-1378.
- 163.- Ignarro L.: Nitric Oxide: A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 1990;16:467-483.
- 164.- Salvemini D.; De Nucci G.; Gryglewski R.J.; Vane JR.: Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:6328-6332.
- 165.- López-Farré A.; Caramelo C.; Esteban A.; Alberola M.L.; Montón M.; Casado S.: Effects of aspirin on platelet-neutrophil interaction. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995;91:2080-2088.
- 166.- Herlin T.; Petersen C.S.; Esmann V.: The role of calcium and cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate in the regulation of glycogen metabolism in phagocytosing human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1978;542:63.
- 167.- Kaplan S.S.; Billiar T.R.; Curran R.D.; Zdziarski U.E.; Simmons R.L.; Basford R.E.: Inhibition of chemotaxis with N^ω-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. In nitric oxide from L-arginine: A bioregulatory system, ed by S. Moncada and E. Higgs, pp 499-500, Elsevier, Amsterdam, 1990.
- 168.- Wyatt T.A.; Lincoln T.M.; Pryzwansky K.B.: Vimentin is transiently colocalized with and phosphorylated by cyclic GMP-dependent protein kinase in formyl-peptide stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 1991;266:21274-21280.
- 169.- Battistini B.; Filep J.G.; Hermán H.; Sirois P.: Endothelin does not affect human platelet aggregation in whole blood and platelet rich plasma. *Thrombosis research* 1990;60:105-108.
- 170.- Thiemeermann C.; Lidbury P.S.; Thomas G.R.; Vane J.R.: Endothelin-1 inhibits ex vivo platelet aggregation in the rabbit. *European Journal of Pharmacol* 1988;158:182-186.
- 171.- Ohlstein E.H.; Storer B.L.; Butcher J.A.; et al.: Platelets stimulate expression of endothelin mRNA and endothelin biosynthesis in cultured endothelial cells. *Circulation Research* 1991;69:832-841.
- 172.- Béa M.L.; Oemar B.S.; Boulanger C.M.; Lüscher T.F.: Platelets stimulate endothelin release in cultured endothelin cells, but inhibit it in intact blood vessels. *Journal of Vascular Research* 1992;29:21A.

- 173.- Rubanyi G.M.: Potential physiological and pathological significance of endothelins. *Drugs of the Future* 1992;17(10):915-936.
- 174.- Achmad T.H.; Rao G.S.: Chemotaxis of human blood monocytes toward endothelin-1 and the influence of calcium channel blockers. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189(2):994-1000.
- 175.- Peacock A.; Dawes K.; Shock A.; et al.: Endothelin-1 and Endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 7:492-499.
- 176.- Bath PM, Mayston SA, Martin JF. Endothelin and PDGF do not stimulate peripheral blood monocyte chemotaxis, adhesion to endothelium, and superoxide production. *Exp. Cell. Res.* 1990; 187: 339-342.
- 177.- Haller H, Schaberg T, Linschau C, Lode H, Distler A. Endothelin increases $[Ca^{2+}]_i$, protein phosphorylation, and O_2^- production in human alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1991; 261:L478-484.
- 178.- McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common Pathway of Endothelial-Leukocyte interaction in Shock, Ischemia, and Reperfusion. *Am J Surg.* 1993; 166: 557-562.
- 179.- Magazine HI, Andersen TT, Bruner CA, Malik AR. Vascular contractile potency of endothelin-1 is increased in the presence of monocytes or macrophages. *Am J Physiol.* 1994; 266:H1620-H1625
- 180.- Enrenreich H.; Anderson R.W.; Fox C.H.; et al.: Endothelins peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 1990;172:1741-1748.
- 181.- Cunningahn M.E.; Bala R.J.; McMillen M.A.: Endothelin-4 is a potent agonist for monocyte cytokine production as endothelin-1. (en prensa)
- 182.- Uprichard A.C.G.; Chi L; Luchessi B.R.: Functional consequence of Big endothelin conversion: demonstration with isolated neutrophils but not in a post-infarction model. *Pharmacology* 1993;47:277-285.
- 183.- Patrignani P.; Del Maschio A.; Bazzoni G.; Daffoncio L.; Hernandez A.; Modica R.; Montesanti L.; Volpi D.; Patrono C.; Dejana E.: Inactivation of endothelin by polymorphonuclear leukocyte-derived lytic enzymes. *Blood* 1991;78(10):2715-2720.
- 184.- Ishida K.; Takeshige K.; Minakani S.: Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:496-500.
- 185.- Chiou C.Y.; Malagodi M.H.: Studies on the mechanism of action of a new Ca^{2+} antagonist, 8-(N,N-diethylamino)octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride in smooth and skeletal muscles. *Br J Pharmacol* 1975;53:279-285.

- 186.- Gryniewicz G.; Poenie M.; Tsien R.Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-3450.
- 187.- Rajkovic I.A.; Williams R.: Rapid microassays of phagocytosis, bacterial killing, superoxide hydrogen peroxide production by human neutrophils in vitro. *J Immunol Methods* 1985;78:37-47.
- 188.- Epstein F.; Brosnan J.T.; Tange J.D.; Ross B.D.: Improved function with amino acids in the isolated perfused kidney. *Am J Physiol* 1982;243:F284-F292.
- 189.- Fishman W.H.: β -Glucuronidase, in H.U. Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edit Verlag Chemie, Weinheim and Academic Press, New York 1974, pp. 929-943
- 190.- Howard T.H.; Oresajo C.O.: The kinetics of Chemotactic Peptide-induced Change in F-Actin content, F-Actin distribution and the shape of neutrophils. *J Cell Biol* 1985;101:1078-1085.
- 191.- Moore P.K.; al-Swayeh O.A.; Chong W.S.M.; Evano R.; Gibson A.: L-N^G-nitro-arginine (L-NOArg), a novel L-arginine reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation. *Br J Pharmacol* 1990;99:408-412.
- 192.- Jaffe E.A.; Nachman R.L.; Becker C.G.; Minick C.R.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 1973;52:2745-2756
- 193.- Maack T.: Physiological evaluation of the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1980;238:F71-F78.
- 194.- Ross B.D.; Epstein F.H.; Leaf A.: Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1973;225:1165-1171.
- 195.- Little J.R.; Cohen J.J.: Effect of albumin concentration on function of isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1974;226:512-51.
- 196.- Clozel J.P.; Clozel M.: Effects of endothelin in the coronary vascular bed in open-chest dogs. *Circ Res* 1989;65:1193-1200.
- 197.- Weyrich A.S.; Ma X.; Lefler A.M.: The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992;86:279-288.
- 198.- Urade Y.; Fujitani Y.; Oda K.; Watakabe T.; Unemura I.; Takai M.; Okada T.; Sakata K.; Karaki H.: An endothelin B receptor selective antagonist: IRL 1038, [Cys 11-Cys 15]-endothelin-1 (11-21)(retraction of Urade Y.; Fujitani Y.; Oda K.; Watakabe T.; Unemura I.; Takai M.; Okada T.; Sakata K.; Karaki H. In *FEBS Lett.* 1992;311(1):12-16.
- 199.- Meister A.; Anderson M.E.: Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983;52:711-760.
- 200.- Gómez-Garré D.; Guerra M.; González E, López-Farré A.; Riesco A.; Caramelo C.;

- Escanero J.; Egido J.: Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes by endothelin: role of platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol* 1992;224:791-796.
- 201.- Hafstrom I.; Ringertz B.; Lundeberg T.; Palmblad J.: The effect of endothelin, neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide and substance P on neutrophil functions. *Acta Physiol Scand* 1993;148:341-346.
- 202.- Prasad K.; Lee P.; Kalra J.: Influence of endothelin on cardiovascular function, oxygen free radicals, and blood chemistry. *Am Heart J* 1991;121:178-187.
- 203.- Bazzoni G.; Guo Chen Z.; Mantovani A.; Dejana E.; Del Maschio A.; Effect of endothelin-1 on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Pharmacol (Life Sci Adv)* 1990;9:373-379.
- 204.- Elferink J.G.; de Koster B.M.: Endothelin-induced activation of neutrophil migration. *Biochem Pharmacol* 1994;48(5):865-871.
- 205.- Stossel T.P.: From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. *J Biol Chem.* 1989;264:18261-18264.
- 206.- Filep G.J.; Fournier A.; Földes-Filep E.: Acute pro-inflammatory actions of endothelin-1 in the guinea-pig lung: involvement of ET_A and ET_B receptors. *Br J Pharmacol* 1995;115:227-236.
- 207.- Clancy R.; Ashok A.; Levartovsky D.; Abramson S.B.: Nitric oxide stimulates ADP-ribosylation of actin in association with the inhibition of actin polymerization in human neutrophils. *J of Leukocyte Biol.* 1995;58:196-202.
- 208.- Mehta J.L.; Lawson D.L.; Nichols W.W.; Mehta P.: Modulation of vascular tone by neutrophils-dependence on endothelial integrity. *Am J Physiol* 1989;257:H1315-H1320.
- 209.- Nguyen B.L.; Saitoh M.; Ware A. Interaction of nitric oxide and cGMP with signal transduction in activated platelets. *Am J Physiol* 1991;261:H1043-H1052.
- 210.- Hibbs J.B.Jr; Taintor R.R.; Vavrin Z.: Macrophage cytotoxicity: Role for L-Arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 1987;235:473-476.
- 211.- Ishii K.; Warner D.T.; Sheng H.; Murad F.: Endothelin-1 stimulates cyclic GMP formation in porcine kidney epithelial cells via activation of the L-arginine-dependent soluble guanylate cyclase pathway. *J of Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17(Suppl 7):S246-S250.
- 212.- Sato H.; Ishii T.; Sugita Y.; Bannai S.: Changes in neutral aminoacid transport activity in myeloid leukemia cells differentiated by lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta* 1989;983:259-263.
- 213.- Sato H.; Ishii T.; Sugita Y.; Bannai S.: Induction of cationic aminoacid transport activity in mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta*

- 1991;1069:46-52.
- 214.- Tsan M.F.; Berlin R.D.: Membrane transport in the rabbit alveolar macrophage. The specificity and characteristics of aminoacid transport systems. *Biochim Biophys Acta* 1971;241:155-169.
- 215.- Strauss P.R.; Berlin R.D.: Effects of serum on membrane transport. *J Exp Med* 1973;137:359-368.
- 216.- Mann G.E.: In *Nitric Oxide from L-Arginine: a Bioregulatory System* (Moncada S. and Higgs E.A. eds) Elsevier, Amsterdam. 1990;331-339.
- 217.- Sneddon J.M.; Bearpark T.M.; Galton S.A.; Vane J.R. In *Nitric Oxide from L-Arginine: a Bioregulatory System* (Moncada S. and Higgs E.A. eds) Elsevier, Amsterdam. 1990;457-461
- 218.- Mann G.E.; Pearson J.D.; Sheriff C.J.; Toothill v.J.: Expression of aminoacid transport systems in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol* 1989;410:325-339.
- 219.- Gopalakrishna R.; Nagarajan B.: Effect of growth and differentiation on distribution of arginase and arginine in rat tissues. *Indian J Biochem Biophys* 1979;16:66-68.
- 220.- Zamecka E.; Prorembska Z.: Five forms of arginase in human tissue. *Biochem Med Metab Biol* 1988;39:258-266.
- 221.- Albina J.E.; Mills C.D.; Barbul A.; Thirkill C.E.; Henry W.L.Jr.; Mastrofrancesco B.; Caldwell M.D.: Arginine metabolism in wounds. *Am J Physiol* 1988 254:E459-E467.
- 222.- Currie G.A.: Activated macrophages kill tumor cells by releasing arginase. *Nature (London)* 1978;273:758-759.
- 223.- Hecker M.; Sessa W.C.; Harris H.J.; Anggard E.E.; Vane J.R.: The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium derived relaxing factor: Cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990;87:8612-8616
- 224.- Buckley B.J.; Mirza Z.; Whorton R.: Regulation of Ca²⁺-dependent nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 1995;269:C757-C765.
- 225.- Albina J.E.; Mills C.D.; Henry W.L.Jr.; Caldwell M.D.: Regulation of macrophage physiology by L-arginine. *J Immunol* 1989;143:3641-3646.
- 226.- Engler R.L.; Dahlgren M.D.; Peterson M.A.; Dobbs A.; Schimd-Schobein G.W.: Accumulation of polymorphonuclear leukocytes during 3 h experimental ischemia. *Am J Physiol* 1986;251:H93-H100.
- 227.- Mehta J.L.; Nichols W.W.; Mehta P.: Neutrophils as potential participants in acute

- myocardial ischemia: relevance to reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:1309-1316.
- 228.- Krämer B.K.; Nishida M.; Kelly R.A.; Smith T.W.: Myocardial actions of a new class of cytokines. *Circulation* 1992;85:531-537.
- 229.- Zimmerman G.A.; McIntyre T.M.: Neutrophil adherence to human endothelium in vitro occurs by CDw18 (Mo1, Mac-1/LFA-1/Gp150,95) glycoprotein-dependent and independent mechanisms. *J Clin Invest* 1988;81:531-537.
- 230.- Goldman G.; Welbourn R.; Klausner J.M.; Valeri C.R.; Shepro D.; Hechtman H.B.: Thromboxane mediates diapedesis after ischemia by activation of neutrophil adhesion receptors interacting with basally expressed intercellular adhesion molecule-1. *Circ Res* 1991;68:1013-1019.
- 231.- Sneddon J.M.; Vane J.R.; Endothelium derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1988;85:2800-2804.
- 232.- Kon V.; Yoshioka T.; Fogo A.; Ichikawa L.: Glomerular actions of endothelin in vivo. *J Clin Invest* 1989;83:1762-1767.
- 233.- Elferink J.G.; de Koster B.M.: Stimulation and inhibition of neutrophil chemotaxis by endothelin-3. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:S142-S144.

Presidente:
Dr. Luis Anzil

Vocales:
Dr. Vicente Arias Chiva
Dr. Carlos Lohar Narquo
Dr. Rosa G^o Delgado

Secretario:
Dr. Houise de la Fuente

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal al
marco de exparte, para juzgar esta tesis doctoral,
concluyó por UNANIMIDAD calificarla

con APTO CON LAUDE
Madrid, 10 de diciembre de 1996

El Secretario del Tribunal

[Signature]

[Signature]
[Signature]
[Signature]

[Signature]
[Signature]