

T 24412

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DEPARTAMENTAL BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

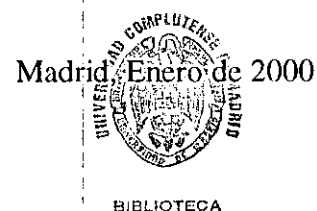
CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE  
ENDOTELINA EN LA RETINA DE RATA Y SU  
IMPLICACIÓN EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA



618264244

125042403

Memoria que presenta el licenciado D. José Ángel de Juan Casero para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas.



Muchos años después, frente al pelotón de fusilamiento, el Coronel Aureliano Buendía había de recordar aquella tarde remota en que su padre lo llevó a conocer el hielo.

Cien años de soledad (Gabriel García Márquez)

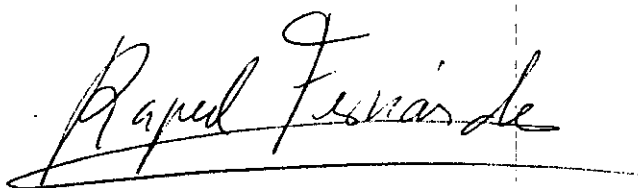
## INFORME DE LA DIRECTORA DE LA TESIS DOCTORAL

Raquel Fernández Durango, Doctora en Ciencias Químicas, Licenciada en Medicina y  
Jefa de Sección en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario San Carlos de  
Madrid

CERTIFICA: que José Ángel de Juan Casero ha realizado bajo su dirección  
un trabajo de investigación titulado "Caracterización de los receptores de  
endotelina en la retina de rata y su implicación en la retinopatía diabética".  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Dicho trabajo reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y rigor  
metodológico necesarios para ser sometido a lectura y discusión ante el  
tribunal.

Madrid, a 27 de Enero del 2000



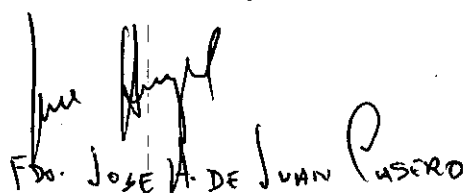
La Directora, Dra. Raquel Fernández Durango

Vº Bº LA TUTORA



FDO: M.ª TERESA PORTOLÉS

EL INTERESADO



FDO: JOSÉ A. DE JUAN CASERO

A May, porque mire hacia donde mire siempre te encuentro.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han puesto su esfuerzo y su voluntad a mi disposición para hacer posible que la realización de este trabajo.

En primer lugar a la Dra. Raquel Fernández Durango directora de esta Tesis Doctoral, por la inteligencia, el entusiasmo y el tesón con el que dirige el laboratorio en el que se ha realizado este trabajo, y también por su orientación, sus consejos, y su constante empuje.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid y a todos sus Profesores por permitirme la realización de los cursos de doctorado y la presentación de este trabajo.

A José Moya, por su apoyo y su amistad durante todos estos años, por su colaboración en la realización de la mayoría de los experimentos y sus opiniones en la redacción del manuscrito.

A Ainhoa Rípodas, Rosa Bernal, José Arencibia y José Angel Marañón, compañeros del laboratorio que han puesto su esfuerzo, su tiempo, y sus conocimientos a mi disposición para que este trabajo se pudiera realizar.

A todos los miembros del personal del Departamento de Medicina Interna III del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y especialmente a Ángela Arroyo, y a Maribel Calvo, por su desinteresada colaboración en la realización de este trabajo. También al Profesor Arturo Fernández Cruz, Jefe de este Departamento, por permitir mi formación y mi trabajo en este Departamento.

A Pablo González, Jefe del Animalario del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y al resto del personal de este servicio, por su colaboración y su asistencia en el cuidado y mantenimiento de los animales.

A la Dra. A. Valverde del Departamento de endocrinología del Hospital de la Concepción de Madrid por su desinteresada colaboración en la determinación de la insulina plasmática.

A May, por su comprensión, su enorme paciencia y su constante apoyo durante estos años, así como por sus acertadas opiniones y sus consejos durante la realización de este trabajo.

A mis padres, por su ejemplo constante de honestidad y dedicación al trabajo, por la educación que he recibido y por haberme transmitido la ilusión por comprender a las personas y a la naturaleza.

# **1. INTRODUCCIÓN**

Las Endotelinas (ETs) forman una familia de péptidos que tienen un potente efecto vasoconstrictor, mayor que el de cualquier otra sustancia endógena hasta ahora conocida. El primer miembro de esta familia fue aislado y caracterizado por Yanagisawa y col. (1988a) a partir del medio de cultivo de células del endotelio vascular porcino. Algunos años antes de este descubrimiento, ya se había sugerido la existencia de sustancias de naturaleza peptídica con acción vasoconstrictora que eran producidas por las células endoteliales (Holden y col., 1983; Hickey y col., 1985), por lo que recibieron el nombre de Factores Constrictores Derivados del Endotelio (EDCFs). En la actualidad, sabemos que estos péptidos también son capaces de producir la relajación del músculo liso vascular, y de provocar vasodilatación, por lo que en conjunto tienen una función vasomoduladora. El descubrimiento de estos péptidos contribuyó a apoyar la idea de que el endotelio vascular no es una simple barrera física entre la sangre y los tejidos, sino que debe ser considerado un órgano activo, modulador de importantes respuestas fisiológicas, como es la reacción del músculo liso de los vasos sanguíneos frente a numerosos factores vasoactivos.

Posteriormente, se ha demostrado que las ETs no sólo están presentes en el sistema vascular, sino que se localizan y se sintetizan en un gran número de órganos y tejidos (Nunez y col., 1990), incluidos el sistema nervioso central (Takahashi y col., 1991a) y los tejidos oculares (McCumber y col., 1989). Sin embargo, a pesar de que en los últimos años se ha desarrollado una intensísima actividad investigadora en todos los campos que tienen alguna relación con las ETs y que se ha avanzado en el conocimiento de los procesos regulados por estos péptidos, es mejor conocida su implicación en procesos fisiopatológicos relacionados con el sistema cardiovascular, y también con otros órganos y sistemas (Shichiri y col., 1990; Rubanyi y col., 1994)). Una de las patologías en las que las ETs pueden desempeñar una función de especial importancia es en la Diabetes Mellitus (DM), ya que se ha demostrado que las fluctuaciones en la concentración de glucosa (Yamanuchi y col., 1990) y de insulina (Hu y col., 1993), alteran la síntesis y producción de endotelina-1 (ET-1) por las células endoteliales.



Puesto que la ET-1 también se ha revelado como un potente mitógeno para las células de músculo liso vascular (Hirata y col., 1989), se ha sugerido que estos péptidos podrían estar involucrados en la etiopatogenia de la aterosclerosis que sufren los pacientes diabéticos (Takahashi y col., 1990). A su vez, debido a sus propiedades vasoactivas y mitogénicas así como a su presencia en los tejidos nerviosos, las ETs podrían estar implicadas en el desarrollo de otras complicaciones asociadas a la DM como la retinopatía o la neuropatía (Siren y col., 1989; De la Rubia y col., 1992).

La inducción de la DM en ratas mediante la inyección de streptozotocina (STZ) (Rakieten y col., 1963) es un modelo experimental, ya clásico, que permite reproducir en estos animales algunas de las características de esta patología, y que nos parece muy adecuado para abordar las posibles interrelaciones entre el sistema de las ETs y las alteraciones vasculares y neurológicas de la retina en la DM.

## **1.1. LA FAMILIA DE LAS ENDOTELINAS.**

### **1.1.1 ESTRUCTURA DE LAS ENDOTELINAS.**

La familia de las ETs está formada por tres péptidos constituidos por 21 aminoácidos (aa). El primero de éstos, caracterizado por Yanagisawa y col., (1988a) posee un peso molecular de 2.495 Da y dos puentes disulfuro entre los residuos 1-15 y 3-11 (Fig. 1). Poco tiempo después, el mismo grupo (Yanagisawa y col., 1988b) identificó, a partir de una genoteca de rata, un segundo miembro de esta familia al que se denominó "endotelina de rata". Posteriormente, se estableció en todas las especies estudiadas la existencia tres péptidos con una elevada homología (Inoue y col., 1989) que han pasado a denominarse Endotelina-1 (ET-1), el caracterizado en primer lugar (Yanagisawa y col., 1988a), Endotelina-3 (ET-3), el identificado en la rata (Yanagisawa y col., 1988b), y un tercer péptido denominado Endotelina-2 (ET-2), que aparece en todas las especies estudiadas (Inoue y col., 1989). Saida y col., (1989) caracterizaron en el ratón la existencia de un homólogo de las ETs, cuya expresión estaba limitada al intestino, al que denominaron "péptido intestinal vasoconstrictor" (VIC). Posteriormente, se ha comprobado que es homólogo a la ET-2 del resto de las especies (Bloch y col., 1991). Existe un gran parecido estructural entre estos péptidos y las

sarafotoxinas, unas toxinas aisladas del veneno de la serpiente *Atractaspis engaddensis* (Kloog y col., 1989a). Todos estos péptidos muestran diez posiciones idénticas en sus secuencias (Fig. 1), incluyendo los cuatro residuos de cisteína entre los que se establecen los puentes disulfuro, que dan lugar a dos anillos de 9 y 8 aa dejando una cola de 6 aa, con un carácter fuertemente hidrofóbico, en el extremo carboxilo.

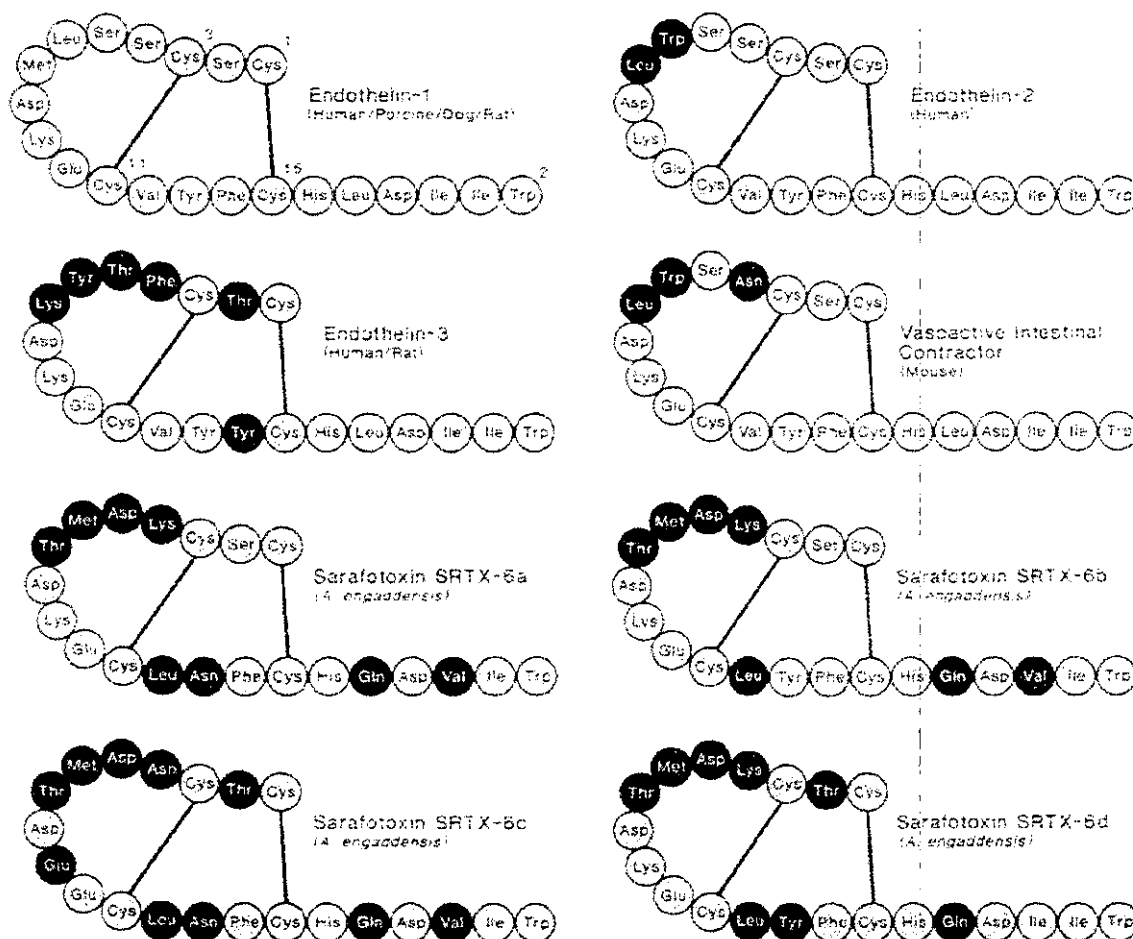


Fig. 1. Secuencia de aminoácidos de los miembros de la familia de las ETs y de las sarafotoxinas (tomado de Cody y col., 1995).

### 1.1.2 ESTRUCTURA, EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE LOS GENES DE LAS ENDOTELINAS.

El análisis de genotecas con fragmentos del gen de la ET-1 ha puesto de manifiesto que existen tres genes que codifican péptidos de esta familia en los humanos y

otros mamíferos (Inoue y col., 1989; Itoh y col., 1988; Kimura y col., 1989). Los genes de la ET-1, ET-2 y ET-3 han sido localizados en los cromosomas 6, 1, y 20 respectivamente, en el genoma humano (Arinami y col., 1991).

El gen de la ET-1 humana, con un tamaño de 6.8 kb, contiene 5 exones y 4 intrones (Inoue y col., 1989) y su expresión está estrechamente regulada por distintos factores nucleares de transcripción (Lee y col., 1991; Dorfman y col., 1992). La expresión de estos genes está controlada en diversos tipos de células por numerosos factores de crecimiento y citoquinas como trombina, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukina 1 (IL-1), insulina, angiotensina II (AGII), péptido atrial natriurético (PAN), y bradikinina, así como otros factores como la tensión de O<sub>2</sub> y la presión hidrostática (ver Rubanyi y Polokoff, 1994, para revisión).

El ARNm de las ETs se expresa en una gran variedad de células y tejidos; en el caso de la ET-1 y la ET-3, el ARNm se ha localizado prácticamente en todos los órganos y tejidos corporales, siendo el pulmón el órgano que presenta una mayor expresión de ET-1, mientras que la ET-3 se expresa en mayor medida en el tubo digestivo, el riñón, el cerebro y el pulmón (Nunez y col., 1990; Sakurai y col., 1991; Firth y col., 1992). El ARNm de la ET-2 presenta una distribución más restringida y se ha detectado en el intestino delgado, en el grueso, y en menor cantidad en el músculo esquelético, corazón y estómago (Firth y col., 1992).

### 1.1.3 BIOSÍNTESIS DE LAS ENDOTELINAS.

En todos los vertebrados, del estudio de la estructura del gen de las ETs se deduce que estos péptidos, al igual que otros segregados por las células, se originan a partir de un ARNm precursor que, una vez procesado, es traducido en forma de preproendotelina (Inoue y col., 1989). Estas preproformas son procesadas enzimáticamente en tres fases (Fig. 2): en primer lugar, una endopeptidasa rompe los enlaces peptídicos entre dos pares de aminoácidos básicos (Arg52-Cys53 y Arg92-Cys93); a continuación, una carboxipeptidasa elimina secuencialmente los residuos Arg92 y Lys91 del extremo carboxilo-terminal originando la proendotelina, que se conoce con el nombre de "big-endotelina"; y por último, una enzima específica

denominada “enzima convertidora de endotelina” (ECE), rompe el enlace entre el Trp73 y la Val74 para liberar el péptido maduro, que denominamos ET. Los puntos de hidrólisis enzimática son los mismos en los tres péptidos (Rubanyi y col., 1994).

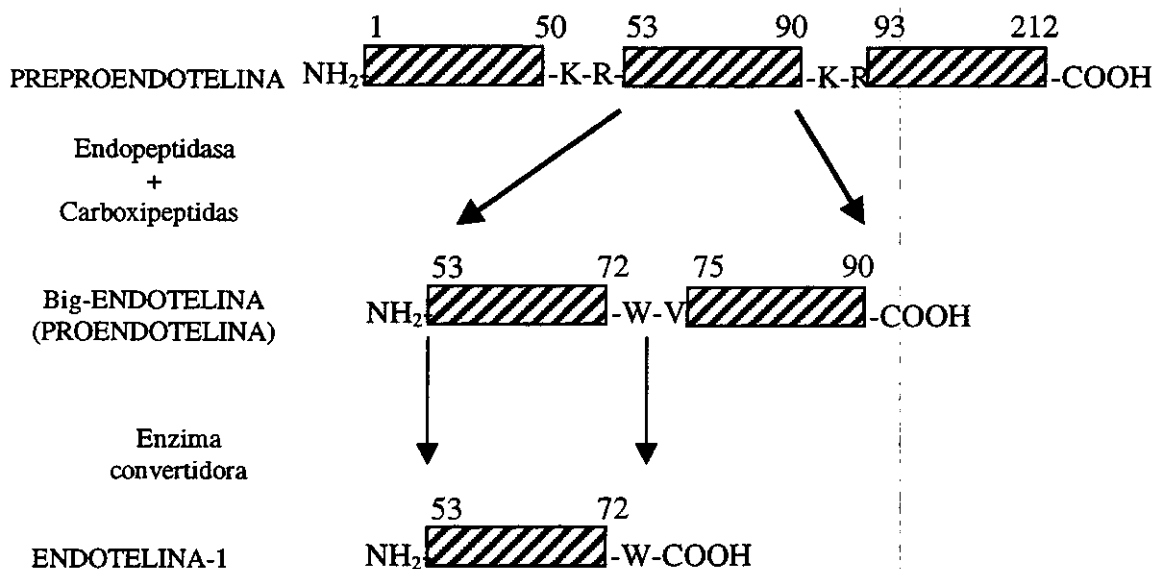


Fig. 2. Transformación enzimática de la preproforma para dar ET-1. El procesamiento de la prepro-ET-2 y ET-3 es análogo (tomado de Rubanyi y col., 1994).

El mecanismo de liberación de las ETs no se conoce con claridad; en la mayor parte de las células productoras parece que no son almacenadas en gránulos de secreción, puesto que estas estructuras no aparecen en dichas células, y además aquellas sustancias que activan su producción lo hacen induciendo su transcripción y traducción (Rubanyi y col., 1994). Sin embargo, en algunos tejidos como la hipófisis posterior parecen existir gránulos de secreción con estos péptidos (Simonson y col., 1991).

El proceso de maduración del prepro péptido a ET tiene una gran importancia fisiológica ya que la ET-1 es 140 veces más potente, como vasoconstrictor, que el propéptido (Kimura y col., 1989), y la preproendotelina no tiene dicho efecto (Cade y col., 1990). Existen al menos dos tipos de ECEs, una presente en el citoplasma celular y otra asociada a la membrana plasmática (Ohnaka y col., 1990; Sawamura y col., 1990),

que presentan características diferentes en lo que se refiere al pH óptimo, la termoestabilidad y la susceptibilidad a los inhibidores. La metaloendopeptidasa de membrana I (MMP I, EC 3.4.24.11), una enzima presente en la membrana plasmática de una gran variedad de células, llamada también encefalinasa, es capaz de transformar las "Big-endotelinas" en endotelinas. Sin embargo, se ha señalado que la principal función *in vivo* (Ebihara y col., 1997) de esta última enzima es la de hidrolizar la ET-1 madura, haciendo que pierda su capacidad vasoconstrictora. Esta enzima es la responsable de la corta vida media de estos péptidos en el plasma.

#### **1.1.4 PRESENCIA DE LAS ENDOTELINAS EN LOS FLUIDOS CORPORALES.**

Las ETs están presentes en cantidades variables en todos los fluidos corporales analizados. Mediante radioinmunoanálisis (RIA), se ha detectado la presencia de ET-1 inmunorreactiva (ET-1-IR), en el plasma humano y de otras especies como rata, cerdo, conejo y perro (Saito y col., 1989a,b), en concentraciones de rango picomolar. De igual manera, se ha podido detectar ET-3-IR en el plasma humano (Gulberg y col., 1992) y de perro (Parker-Botelho y col., 1991). Así mismo, se ha detectado ET-1-IR y ET-3-IR en concentraciones superiores a las detectadas en plasma, en la orina (Berbinschi y col., 1989) y en el líquido cefalorraquídeo humano (Hirata y col., 1990; Ando y col., 1991). También están presentes en el humor acuoso humano (Lepple-Wienhues y col., 1992).

La vida media de estos péptidos en el plasma es muy corta, de aproximadamente un minuto en la rata (Sirvio y col., 1990), y se ha demostrado que su degradación se produce principalmente en el pulmón, aunque también colaboran, en menor medida, el riñón, el hígado y el corazón (Sirvio y col., 1990). La rápida degradación de las ETs indica que la acción de estos péptidos, más que endocrina, es de tipo paracrina, y en este sentido, se ha demostrado que las ETs son segregadas por las células endoteliales hacia la pared del vaso y no hacia la luz, para actuar sobre las células de músculo liso que presentan receptores para estos péptidos (Lovenberg y col., 1990; Abassi y col., 1992). Además, deben tener una acción autocrina puesto que algunas células secretoras de ET-1, como las células endoteliales, presentan receptores específicos (Vigne y col., 1991; Ishibasi y col., 1992) que actúan regulando el funcionamiento de estas células.

## **1.2. RECEPTORES DE MEMBRANA DE LAS ENDOTELINAS.**

### **1.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE LAS ENDOTELINAS. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS ESPECÍFICOS.**

Poco tiempo después del aislamiento y la caracterización de las ETs fue posible establecer la existencia de sitios de unión, saturables y de alta afinidad, en las membranas de las células de una gran variedad de tejidos. La unión a estos receptores de membrana desencadena, de manera similar al mecanismo de acción de otros péptidos activos, su efecto biológico.

Antes de que se pudiera clonar el ADNc de estos receptores ya habían sido caracterizados, mediante estudios farmacológicos y fisiológicos, dos tipos de sitios de unión específicos. Uno de ellos presenta una mayor afinidad por ET-1 y ET-2 que por ET-3 y ha sido denominado "Receptor de endotelina tipo A" (ETA), mientras que un segundo receptor denominado "Receptor de endotelina tipo B" (ETB), presenta similar afinidad por los tres péptidos (Masaki y col., 1994).

En el proceso de caracterización de los receptores en los distintos tejidos se han empleado toda una serie de agonistas y antagonistas de estos receptores que han permitido determinar, por una parte, el tipo y la proporción de receptores presentes en los distintos tejidos y, por otra, su actividad fisiológica. Los primeros análogos de las ETs que se han desarrollado son péptidos que reproducen algunas de sus características estructurales pero carecen de otras, lo que les confiere una alta afinidad por uno de los dos receptores y una baja afinidad por el otro (Cody y col., 1995). Entre los más frecuentemente utilizados se encuentran el hexapéptido cíclico BQ-123 y la Sarafotoxina 6c (S6c), que son los dos análogos que hemos empleado en nuestro trabajo. El BQ-123, es un antagonista específico del receptor ETA (Eguchi y col., 1992), y la S6c es un agonista muy selectivo de los receptores ETB (Williams y col., 1991). Actualmente, gracias a estos y otros análogos de las ETs, los receptores ETA y ETB se clasifican a su vez en diferentes subtipos dependiendo de su afinidad por los mismos (Zimmermann y col., 1998, para revisión).

Debido a la importante función fisiológica de las ETs, también se han aislado o diseñado antagonistas no peptídicos de pequeño peso molecular, que pueden ser administrados oralmente y, por tanto, pueden constituir una herramienta terapéutica en el tratamiento de aquellas patologías en las que se encuentran implicadas las ETs. Este es el caso del bosentan, un derivado de las pirimidil-sulfonamidas (Clozel y col., 1993, y 1994), que es un antagonista de los dos tipos de receptores de las ETs y que, administrado oralmente, es capaz de inhibir su acción vasoconstrictora (Clozel y col., 1993). Este compuesto es capaz de prevenir, en varios modelos experimentales, la vasoconstricción producida por las ETs en situaciones patofisiológicas como el vasoespasma cerebral y la isquemia renal (Clozel y col., 1993b). También se ha demostrado su efecto sobre los vasos humanos (Nilsson y col., 1997), en los que es capaz de inhibir la acción vasoconstrictora de la ET-1. Estas investigaciones apuntan hacia el uso de estos antagonistas en diversas patologías vasculares como la aterosclerosis o la hipertensión. Otro antagonista, que también puede ser administrado oralmente, es el PD156707 (Doherty y col., 1995) que presenta, frente al bosentan, la ventaja de ser específico de los receptores ETA, por lo que se ha sugerido que puede ser especialmente útil en aquellas patologías en las que no interesa bloquear los receptores ETB (Harland y col., 1998).

### **1.2.2 CLONACIÓN DEL ADNc DE LOS RECEPTORES DE LAS ENDOTELINAS.**

La clonación de los ADNc que codifican los dos tipos de receptores de las ETs fue realizada de forma casi simultánea por dos grupos distintos. Arai y col. (1990) clonaron el ADNc del receptor ETA a partir de una genoteca de pulmón bovino, el polipéptido codificado posee 427 aa y un peso molecular de 48.516 Da. A su vez, Sakurai y col. (1990) clonaron el receptor ETB a partir de una genoteca de pulmón de rata, el polipéptido obtenido posee 441 aa y un peso molecular de 46.901 Da. Posteriormente se han clonado los genes de los dos receptores en otros tejidos y especies (ver Sokolovsky y col., 1992, para revisión), comprobándose que existe una gran homología entre ambos receptores para una determinada especie, así como entre diferentes especies para un mismo tipo de receptor.

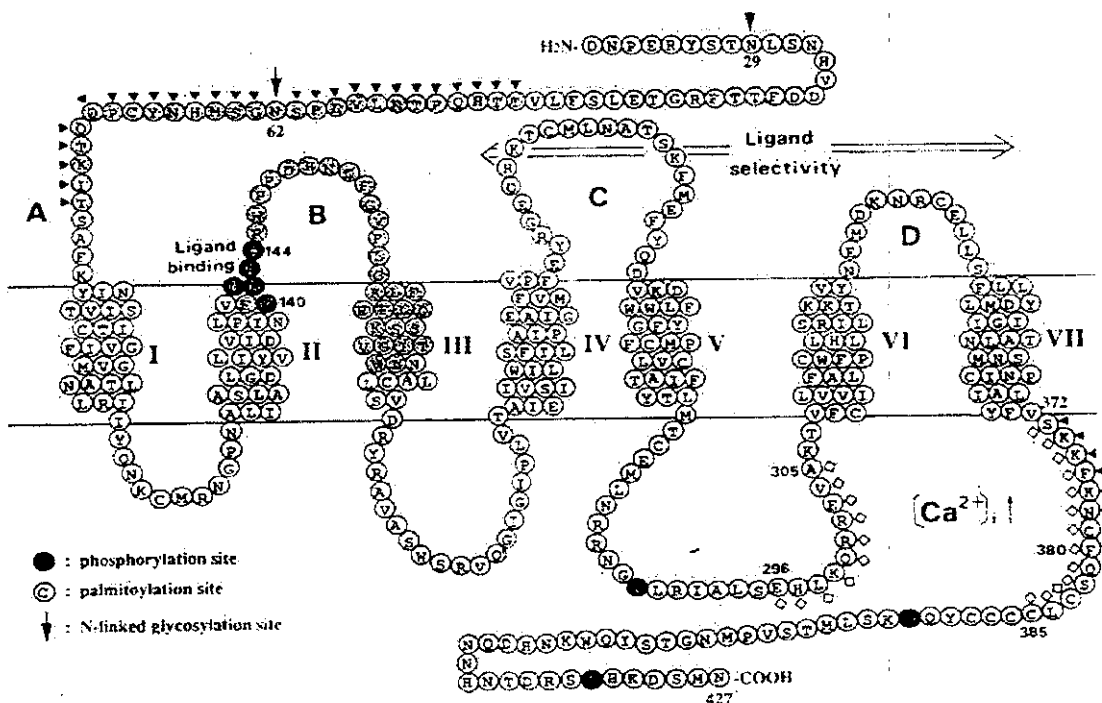
Existen abundantes pruebas que apoyan la existencia de un tercer tipo de receptor, que ha recibido el nombre de "Receptor de endotelina tipo C" (ETC), que tendría una mayor afinidad por ET-3 que por ET-1 y por ET-2. Estas pruebas proceden de estudios farmacológicos que demuestran que la ET-3 provoca respuestas biológicas con una mayor potencia que los otros isopéptidos; por ejemplo, la ET-3 es más potente que la ET-1 o la ET-2 en la vasoconstricción de la microcirculación hepática (Kurihara y col., 1992) o en la inhibición de la secreción de la prolactina por la hipófisis (Samson y col., 1991). A pesar de estos datos, hasta la fecha, no se ha podido clonar en ninguna especie de mamífero un ADNc que codifique un polipéptido que presente el perfil farmacológico de un receptor ETC. Sin embargo, Karne y col. (1993) han clonado, a partir de melanóforos dérmicos del *Xenopus laevis*, un ADNc que codifica para un receptor que manifiesta algunas de las características farmacológicas de un ETC: la ET-3 es 400 veces más eficaz que la ET-1 y que la ET-2 en la estimulación de la dispersión de los granos de pigmento que contienen estas células. Sin embargo, en estudios de unión de radioligandos, la ET-3 sólo es 4 veces más potente que la ET-1 al competir por la unión de  $^{125}\text{I}$ -ET-3 a estos receptores ETC, presentes en los melanóforos de *X. laevis*.

### 1.2.3 ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES DE ENDOTELINA.

El análisis de la secuencia de aa de los receptores de las ETs demuestra que los tres tipos de receptores clonados (Arai y col., 1990; Sakurai y col., 1990; Karne y col., 1993) pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana en  $\alpha$ -hélice acoplados a proteínas G heterotriméricas (Birbaumenr y col., 1990). Estos receptores poseen un dominio extracelular amino-terminal, un dominio transmembrana, y un dominio carboxi-terminal intracelular (Fig. 3).

El dominio amino-terminal está formado por, aproximadamente, 75 residuos aminoacídicos, dependiendo de la especie estudiada, y es el que presenta mayores diferencias, en su secuencia de aa, al comparar los tres tipos de receptores (Karne y col., 1993). Este dominio, junto con los bucles extracelulares, está directamente implicado en la unión al ligando.





**Fig. 3.** Estructura del receptor ETA humano. Los aminoácidos están numerados partiendo de la metionina inicial, aunque los 20 primeros aminoácidos, que corresponden al péptido señal, no se muestran. Los aminoácidos 140 a 144 (círculos oscuros) constituyen el sitio de unión de la ET-1. Los aminoácidos 40-76 y 373-380 (▼) son necesarios para la unión de la ET-1. Los aminoácidos 296-305 y 373-385 (◇) están implicados en la transducción de la señal. La capacidad para discriminar entre sus ligandos reside en la región señalada con la flecha (⇔). (tomado de Adachi y col., 1993).

El dominio transmembrana consiste en siete  $\alpha$ -hélices que atraviesan la membrana, estando conectadas entre sí por tres bucles extracelulares y tres intracelulares. La secuencia de aa que forma las hélices transmembrana y los bucles que las conectan, se mantiene bastante constante dentro de la familia de receptores de las ETs, al igual que en el resto de los miembros de esta superfamilia, ya que está implicada en la internalización del ligando y en la unión con la proteína G (Franke y col., 1990).

El dominio carboxi-terminal es intracelular y también presenta diferencias importantes en su secuencia entre los tres receptores de las ETs. Este dominio está implicado en la unión del receptor a la bicapa lipídica de la membrana, y se ha demostrado que es esencial para un correcto reconocimiento del ligando por el receptor, a la vez que presenta sitios de fosforilación que son muy importantes para la regulación de la actividad de estos receptores (Adachi y col., 1992).

## **1.2.4 ESTRUCTURA DE LOS GENES DE LOS RECEPTORES DE ENDOTELINA Y REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN.**

Los genes humanos de los receptores ETA y ETB han sido clonados y caracterizados (Hosoda y col., 1992; Arai y col., 1993). El gen del receptor A está situado en el cromosoma 4, tiene 40 kb, y presenta 8 exones y 7 intrones. El gen del receptor B está situado en el cromosoma 13, tiene 24 Kb, y presenta 7 exones y 6 intrones. Pese a que el gen del ETA tiene un intrón más que el del ETB en la región 5', ambos genes conservan los mismos sitios para el procesamiento postranscripcional, lo que sugiere un origen evolutivo común (Arai y col., 1993; Rubanyi y col., 1994).

La expresión de los genes de los receptores de las ETs está estrechamente regulada por la presencia de sus ligandos. Se ha demostrado que el tratamiento con ET-1 provoca una disminución en la densidad de sitios de unión para este péptido (downregulation) en numerosos tipos de células, como las células de músculo liso vascular (Hirata, 1988) y los astrocitos (Ehrenreich y col., 1993). También se ha demostrado que la ET-3 tiene un efecto parecido en las células de osteosarcoma (Sakurai y col., 1992). Existen otros factores capaces de alterar la producción de estos receptores. Así, el fosforamidón, un inhibidor de la ECE, y que por tanto disminuye la producción de ET-1, incrementa el número de receptores de ET-1 (Clozel y col., 1993a), mientras que los ésteres de forbol, a través de la activación de la proteína kinasa C (PKC) disminuyen la expresión de estos receptores (Resink y col., 1990).

## **1.2.5 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ENDOTELINA.**

Utilizando técnicas de unión covalente de afinidad (cross-linking) y posterior electroforesis en geles de poliacrilamida ha sido posible caracterizar los sitios de unión de las ETs en las membranas celulares. En todos los tejidos estudiados (Ambar y col., 1990; Schwartz y col., 1990, 1991; de Juan y col., 1993), con este tipo de experimentos, se obtienen dos bandas que corresponden a un peso molecular de, aproximadamente, 30 y 50 KDa. Experimentos posteriores en los que se utilizaron inhibidores de la proteólisis, permitieron demostrar que la banda de menor peso molecular corresponde a un producto

de degradación de la banda de 50 KDa (Kozuka y col., 1991). Por tanto, y puesto que no existe evidencia de que a partir de los genes de los receptores de estos péptidos pueda traducirse una proteína con un peso molecular de entre 30 y 35 KDa, los polipéptidos caracterizados en los experimentos de unión covalente de afinidad que presentan pesos moleculares de esta magnitud, se corresponden con productos de degradación de dichos receptores, que son fácilmente hidrolizables en su extremo amino-terminal (Saito y col 1991).

Por otra parte, Nakajo y col. (1990) consiguieron solubilizar, utilizando una mezcla de detergentes en condiciones poco agresivas, una forma no desnaturalizada del receptor con un peso molecular de 340 KDa, lo que indica que en las membranas los receptores de ETs deben encontrarse formando agregados con otros polipéptidos.

### 1.2.6 MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL.

Las rutas de señalización intracelular activadas por la unión de las ETs a sus receptores (Fig. 4) han sido estudiadas en diversos tipos celulares, como en las células de músculo liso vascular (Hirata y col., 1988), en células endoteliales (Warner y col., 1992), en células mesangiales de glomérulo renal (Simonson y col., 1990) y en astrocitos (Cazaubon y col., 1993).

En la mayor parte de los tejidos, la unión de las ETs a sus receptores activa la fosfolipasa C (PLC). Existen evidencias de que este mecanismo de transducción es dependiente de una proteína Gq (Reynols y col., 1989; Warner y col., 1992). La activación de la PLC, que se produce de forma rápida y transitoria al tratar las células con ETs, genera diacilglicerol (DAG), e inositoltrisfosfato (IP3) mediante la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana. El DAG, desde la membrana plasmática, activa la PKC, que es capaz de fosforilar numerosos sustratos dentro de la célula, mientras que el IP3 se une a receptores presentes en la membrana del retículo endoplásmico abriendo canales para el calcio, que permiten la liberación de este ion dentro del citoplasma, desde estos reservorios intracelulares.

Las ETs también son capaces de inducir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en las células, mediante la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la membrana plasmática (Yanagisawa y col.; 1988a). El  $\text{Ca}^{2+}$  es el mensajero intracelular que media en la mayor

parte de los procesos celulares desencadenados por las ETs, incluyendo la contracción de las células musculares y la síntesis de óxido nítrico (NO) (De Nucci y col., 1988). El NO, un gas capaz de atravesar las membranas celulares, es producido a partir del aa L-Arginina, por la óxido-nítrico sintasa (NOS), enzima de la que existen tres isoformas (Kuo y col., 1995). Una de estas isoformas es expresada por las células nerviosas (nNOS) y aparece en forma soluble en el citoplasma celular, otra es expresada por las células endoteliales (eNOS) y, en su forma activa, se encuentra unida a las membranas celulares, ambas isoformas se activan por la unión a  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. La tercera (iNOS), es una enzima inducible, a diferencia de las dos anteriores que son constitutivas, y se expresa en distintos tipos de células, en respuesta a diversos factores de crecimiento y ciertas toxinas, en procesos relacionados con la infección e inflamación de los tejidos. Al tratarse de una sustancia difusible, el NO producido por una célula, puede actuar sobre otras que se encuentren próximas, siendo de esta manera como ejerce su función vasorreguladora, así el NO producido por las células endoteliales difunde hasta las células del músculo liso vascular provocando su relajación (Kuo y col., 1995). El incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular también es responsable de la activación del dominio tirosina-quinasa de receptores de membrana que inician la cascada de señalización intracelular dependiente de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina que provocan las ETs (Cazaubon y col., 1993, Iwasaki y col., 1999).

Por otra parte, la unión de las ETs a su receptor provoca la alcalinización del citoplasma celular, mediante un mecanismo estimulado por la PKC, que activa el intercambio de iones  $\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+$  con el exterior de la célula a través de la membrana (Gardner y col., 1989).

Otro sistema de transducción de la señal que las ETs desencadenan en las células del músculo liso vascular (Reynolds y col., 1989; Abdel Latif y col., 1991) y en las células mesangiales (Simonson y col., 1990), es el producido por la activación de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , bien directamente a través de una proteína G o indirectamente debido al aumento del  $\text{Ca}^{2+}$ , produciendo la liberación de tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) y prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ).

También ha podido demostrarse que los receptores de ETs al unirse a sus ligandos pueden interaccionar con otros tipos de proteína G, distintos de los que intervienen en la ruta de la PLC, induciendo en unos casos, e inhibiendo en otros, la formación de AMPc, un segundo mensajero que media en algunas de las reacciones de las células en respuesta a las ETs (Eguchi y col., 1992).

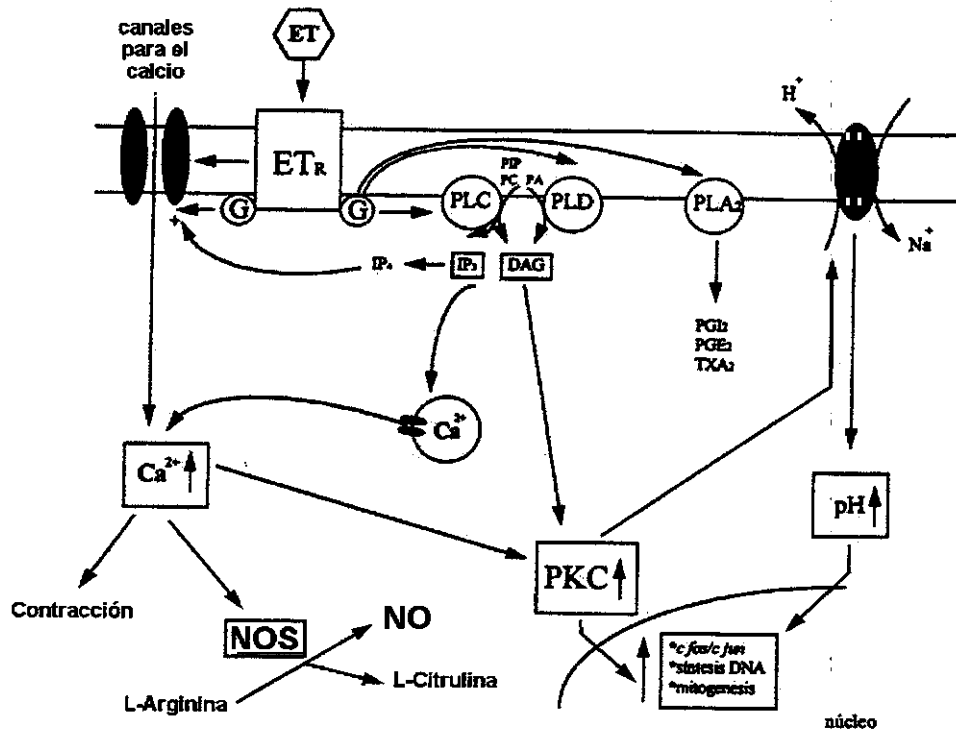


Fig. 4. Representación esquemática de las rutas de transducción de la señal tras la activación de los receptores de membrana de las ETs. (DAG) diacilglicerol, (ET) endotelina, (IP<sub>3</sub>) inositoltrisfosfato, (NO) óxido nítrico, (NOS) óxido nítrico sintasa, (PGI<sub>2</sub>) prostaciclina, (PKC) proteína quinasa C, (PLA<sub>2</sub>) fosfolipasa A<sub>2</sub>, (PLC) fosfolipasa C, (PLD) fosfolipasa D; (TXA<sub>2</sub>) tromboxano A<sub>2</sub> (modificado de Rubanyi y col., 1994).

Las cascadas de señalización intracelular activadas por las ETs no sólo dan lugar a respuestas inmediatas, como la contracción del músculo liso vascular, sino que también regulan la expresión de diversos genes originando respuestas celulares de más larga duración. Así, se ha demostrado que las ETs activan la transcripción de los genes de la familia *fos* y *jun* (Simonson y col., 1992), que codifican proteínas que son factores de transcripción, y activan la expresión de numerosos genes celulares, entre los que se encuentran los de algunos factores de crecimiento (Ladenhein y col., 1993). De esta manera, las ETs estimulan la síntesis de ADN y la proliferación de varios tipos celulares (Komuro y col., 1998), aunque su actividad mitogénica necesita, o es potenciada, por varios factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Janakidevi y col., 1992), o la insulina (Lonchamp y col., 1991).

### 1.3. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LAS ENDOTELINAS.

A pesar de que fueron aisladas y caracterizadas gracias a sus importantes propiedades vasoactivas, las ETs presentan además otros efectos fisiológicos y se encuentran presentes en todos los sistemas y órganos estudiados.

#### 1.3.1 SISTEMA VASCULAR.

La inyección intravenosa de ET-1 provoca una rápida y pasajera vasodilatación, seguida de una potente y duradera vasoconstricción, mayor que la producida por ningún otro péptido endógeno aislado hasta ahora. La vasodilatación es debida a la activación de los receptores ETB, presentes en las células endoteliales, que provocan la liberación de factores vasorrelajantes como PGI<sub>2</sub> y óxido nítrico (Yanagisawa y col., 1988b, De Nucci y col., 1988). La vasoconstricción, es producida por la unión de la ET-1 a los receptores ETA presentes en las células de músculo liso vascular, que se contraen en respuesta al incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular (King y col., 1989). Se ha demostrado, usando análogos específicos, que la activación de receptores ETB también provoca vasoconstricción en algunos tipos de vasos (Webb y col., 1995).

Las ETs manifiestan un poderoso efecto sobre los vasos de pequeño calibre. En los capilares, vénulas y arteriolas, la ET-1 ejerce un potente efecto vasoconstrictor, mayor que el de la ET-3, indicando que es el receptor ETA, principalmente, el mediador de dicha respuesta (Deng y col., 1991). Sin embargo, se ha descrito la existencia de microvasos en los que ET-1 y ET-3 son equipotentes (Takaori y col., 1992), e incluso en algunos casos la ET-3 presenta un mayor efecto vasoconstrictor que la ET-1, lo que sugiere la presencia de receptores tipo ETC (Kurihara y col., 1992). De acuerdo con estos resultados, estudios *in vitro* demuestran que las células endoteliales de los capilares segregan ET-1, provocando la contracción, así como la proliferación de los pericitos asociados, que presentan receptores de alta afinidad por la ET-1 (Takahashi y col., 1989; Frelin y col., 1992). La inyección intravenosa de ET-1 produce el aumento de la permeabilidad de los vasos en numerosos órganos (Filep y col., 1991), aunque este efecto no parece ser debido a una actuación directa de la ET-1 sobre la pared vascular,

sino que es mediado por otros factores, como el factor activante de plaquetas (PAF) (Filep y col., 1991), o el péptido atrial natriurético (PAN) (Valentin y col., 1992), cuya producción es modulada por las ETs.

### 1.3.2 SISTEMA NERVIOSO.

Numerosos trabajos demuestran que las ETs están presentes en el sistema nervioso de los mamíferos, en el que desempeñan funciones importantes. El ARNm de la ET-1 ha sido localizado en el encéfalo humano y de otras especies (Lee y col., 1990), en neuronas de la médula espinal humanas (Giaid y col., 1989) y en distintos tipos de células gliales de la rata (McCumber y col., 1990). Por otra parte, se ha detectado ET-1-IR y ET-3-IR en la corteza cerebral humana (Fernández-Durango y col., 1994) y en el líquido cefalorraquídeo (Ando y col., 1991). Además, están presentes en el hipotálamo desde donde son transportadas hasta la hipófisis posterior para su liberación (Simonson y col., 1991). En lo que se refiere a los receptores, tanto el ETA como el ETB, están presentes en el tejido neural de las distintas regiones del encéfalo y la médula espinal (Jones y col., 1991; Fernández-Durango y col., 1994), y en los ganglios del sistema nervioso periférico (Giaid y col., 1989).

Las ETs regulan la circulación en los vasos sanguíneos que irrigan el sistema nervioso (Siren y col., 1989), y se ha demostrado que ejercen una acción vasoconstrictora al actuar sobre sus receptores ETA y una acción vasorrelajante actuando sobre los receptores ETB en los vasos cerebrales humanos (Nilsson y col., 1997). Las ETs funcionan como neuropéptidos en el sistema nervioso. Uno de sus efectos sobre el sistema nervioso central es la modulación de la secreción de algunas de las hormonas del eje hipotálamo-hipofisario. La ET-1 (Stojilkovic y col., 1990) y la ET-3 (Samson y col., 1991) estimulan, en la rata, la secreción de gonadotropinas desde la parte anterior de la hipófisis y la liberación de la vasopresina desde el hipotálamo (Shichiri y col., 1989). Además, de forma selectiva, la ET-3 inhibe la liberación de prolactina en cultivos de células hipofisarias de rata (Samson y col., 1990). También se ha descrito la acción despolarizante de las ETs en las neuronas de la médula espinal de rata (Yoshizawa y col., 1989). En el sistema nervioso periférico, inhiben la secreción de neurotransmisores en las terminales simpáticas (Nakamura y col., 1989), y también

activan la secreción de acetilcolina en las neuronas parasimpáticas, a la vez que potencian la contracción del músculo liso intestinal inducido por las terminales parasimpáticas (Wiklund y col., 1989). Las células gliales también son sensibles a las ETs. Los cultivos de astrocitos producen ET-1 y además presentan los dos tipos de receptores de estas hormonas (Ehrenreich y col., 1991); también se ha demostrado que las ETs tienen un efecto mitogénico sobre estas células (McCumber y col., 1990; Battistini y col., 1993), actuando sobre los receptores ETA (Hama y col., 1992).

### 1.3.3 OTROS ÓRGANOS Y SISTEMAS.

A parte de sus efectos vasoactivos y neuromoduladores las ETs tienen una gran importancia en la regulación de otros muchos sistemas corporales.

En el riñón, además de reducir intensamente el flujo sanguíneo mediante la vasoconstricción de los vasos renales (Goetz y col., 1988), provocan una reducción de la tasa de filtración glomerular y de la excreción de  $\text{Na}^+$  (Miller y col., 1989). Sin embargo, se ha demostrado que la infusión sistémica de ET-1 provoca un aumento en el volumen de orina, que es debido a una reducción en la reabsorción de agua en el túbulo de las nefronas (Goetz y col., 1988). Por otra parte, la ET-1 activa las cascadas de señalización intracelular en las células mesangiales del glomérulo (Simonson y col., 1990) produciendo su contracción, a la vez que tiene una acción mitogénica sobre estas células en cultivo (Badr y col., 1989).

La ETs también desempeñan una importante función en la regulación de diversos sistemas hormonales. Por ejemplo, aumentan los niveles circulantes del péptido atrial natriurético (PAN), de la renina, de la aldosterona, y de las catecolaminas (Goetz y col., 1988; Miller y col., 1989). También son secretadas por el tiroides que además presenta receptores para estos péptidos (Tseng y col., 1993). En los acinos del páncreas humano, se han detectado los dos tipos de receptores, aunque todavía no se ha determinado que función puedan tener (Hildebrand y col., 1993).

Las ETs ejercen una acción mitogénica sobre diversos tipos de células en cultivo, como las células de músculo liso vascular, los pericitos vasculares, las células mesangiales del glomérulo, los fibroblastos o las células gliales (McCumber y col., 1990; Eguchi y col., 1992; Yamagishi y col., 1993). Su acción mitogénica, mediada principalmente



por el receptor ETA, se ve incrementada cuando actúan en combinación con otros factores de crecimiento como: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), por lo que se ha sugerido que las ETs pueden actuar regulando la actividad de estos factores de crecimiento, más que como agentes mitogénicos en sí (ver Battistini y col., 1993, para revisión).

Por otra parte, las ETs tienen una importante función organogenética que se ha investigado mediante el desarrollo de ratones transgénicos deficientes en el gen de las ETs y sus receptores. Los ratones deficientes para el gen de la ET-1 presentan un desarrollo anormal de los tejidos craneofaciales, así como disfunciones cardiovasculares (Kurihara y col., 1994). Recientemente, en ratones deficientes para el gen del receptor ETA, se ha comprobado que la ET-1 actúa sobre estos receptores para controlar el desarrollo de los tejidos craneofaciales (Clouthier y col., 1998). En los ratones con defectos en el gen de la ET-3 (Baynash y col., 1994) o del receptor tipo B (Hosoda y col., 1994), se producen anomalías en células derivadas de la cresta neural, como las neuronas de los ganglios mioentéricos, o los melanocitos epidérmicos (Baynash y col., 1994; Hosoda y col., 1994) a la vez que sugiere que la ET-3 es el ligando natural del receptor ETB durante el desarrollo.

## **1.4. ENDOTELINAS Y OJO.**

Las ETs tienen importantes funciones en el ojo, ya que se ha descrito su implicación en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos en este órgano.

### **1.4.1 ESTRUCTURA GENERAL DEL OJO.**

El ojo es un órgano fotorreceptor con forma esferoidal (Fig. 5). La pared del globo ocular está constituida por una capa corneoescleral externa, una capa media denominada úvea y una capa interna llamada retina.

La capa corneoescleral se subdivide en una región anterior y transparente, denominada córnea, que permite el paso de la luz al interior de la estructura ocular, y la esclera, blanquecina y opaca, que protege las delicadas estructuras intraoculares y sirve de armazón para mantener la forma y consistencia del globo ocular.

La capa media o úvea está constituida por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La coroides es la porción vascular de la úvea y está situada rodeando a la retina. La coroides se continua, en la parte anterior del globo ocular, con el cuerpo ciliar cuya principal función es controlar el diámetro y la forma del cristalino, que se encarga de dirigir y enfocar la luz hacia la retina. La porción anterior de la úvea es el iris, una delgada lámina de tejido que se continúa con el cuerpo ciliar y que presenta una abertura central, la pupila, cuyo diámetro puede ser variado gracias a la presencia de células contráctiles, y que, por tanto, funciona como un diafragma.

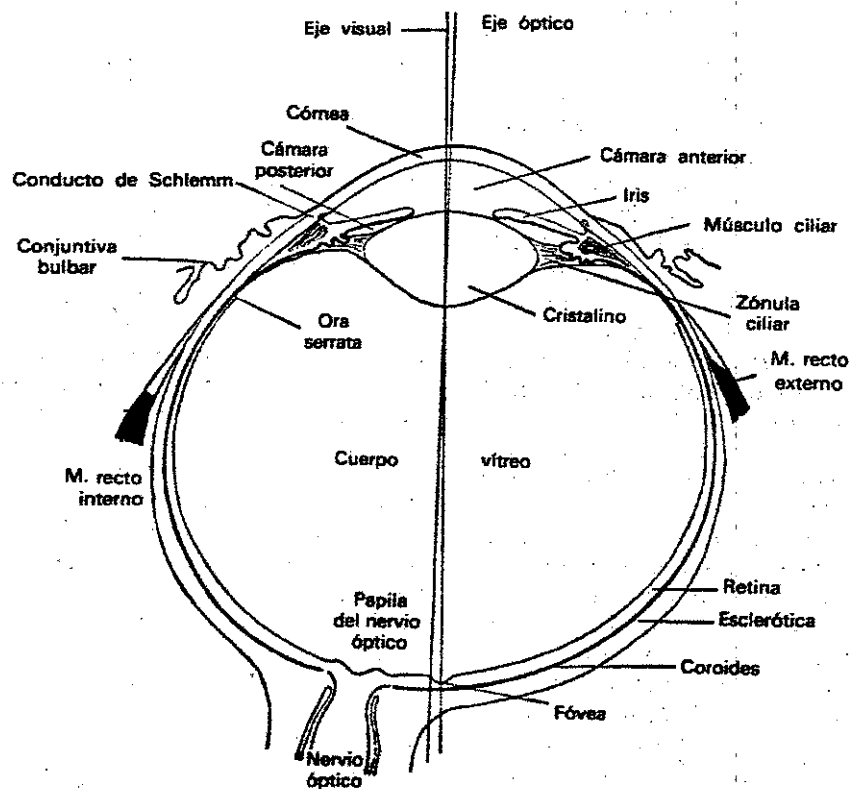


Fig. 5. Esquema de un corte meridional horizontal a través del ojo derecho (tomado de Fawcett, 1988).

La retina contiene células fotorreceptoras que captan la luz, transformándola en un impulso nervioso. Una cadena de neuronas de la propia retina transmite el impulso generado hacia el nervio óptico. El disco óptico, papila, o punto ciego es el lugar de la retina por el que salen del ojo las fibras del nervio óptico. En el polo posterior del ojo, coincidiendo con el eje visual, en la retina aparece una depresión en forma de embudo

que se denomina fovea central o mácula. En este lugar, las capas más internas de la retina se encuentran desplazadas lateralmente, por lo que la luz llega directamente a los fotorreceptores. Es la porción de la retina que proporciona mayor agudeza visual.

La cavidad interna del globo ocular puede ser dividida en una cámara anterior, una posterior y una cavidad del vítreo. Cada una de ellas está rellena por un material transparente, que además contribuye al mantenimiento de la forma y consistencia del ojo. Las cámaras anterior y posterior están conectadas por el orificio pupilar y contienen el denominado humor acuoso, que circula y provee de nutrientes a las estructuras anteriores del ojo. La cavidad vítrea, separada de la cámara posterior por el cristalino y el cuerpo ciliar, se encuentra rellena por un gel transparente y viscoso denominado humor vítreo, que actúa como un soporte estructural para la parte posterior del ojo.

#### **1.4.2 SÍNTESIS Y LOCALIZACIÓN DE LAS ENDOTELINAS EN EL OJO.**

Las ETs están presentes en los distintos tejidos oculares, McCumber y col. (1989) detectaron, mediante hibridación *in situ*, el ARNm de estos péptidos en la córnea, la coroides y la retina de rata. Los mismos autores (McCumber y col., 1990) detectaron la presencia de ET-1-IR y ET-3-IR en el iris, la coroides, la retina y el cuerpo ciliar de conejo. Chakravarthy y col. en 1994, mostraron la existencia de ET-1-IR y ET-3-IR en todos los tejidos oculares humanos, de rata y de cerdo, excepto en la córnea, la cual no contiene ET-3-IR. La concentración de ET-3-IR es significativamente mayor que la ET-1-IR en todos los tejidos del ojo, encontrándose los niveles más altos de ET-3-IR en la coroides. Nuestro grupo ha demostrado la presencia de ET-1-IR y ET-3-IR en la retina de rata (De Juan y col., 1993; 1995), siendo mayor la concentración de ET-3-IR que la de ET-1-IR. También se ha detectado ET-1-IR en el humor acuoso humano, a una concentración superior a la de la sangre (Lepple-Wienhues y col., 1992). Igualmente, se ha comprobado que en cultivos de células endoteliales de los microvasos de la retina se produce ET-1 (Takahashi y col., 1989). Utilizando técnicas de inmunohistoquímica Wollesak y col. (1998), han localizado ET-1-IR en los vasos de la retina y en el nervio óptico, pero no en la retina neural. Sin embargo, Sitt y col. (1996) han descrito la presencia de ET-1-IR y ET-3-IR en la capa plexiforme externa y en la capa de

fotorreceptores de la retina humana y de rata. Estos resultados demuestran que las ETs están presentes en el ojo, y sugieren que estos péptidos pueden tener un doble origen, por una parte pueden acceder al ojo mediante la circulación oftálmica, y por otra pueden ser sintetizadas por las células de los distintos tejidos oculares.

### **1.4.3 LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE LAS ENDOTELINAS EN EL OJO.**

Existe abundante bibliografía que demuestra la existencia de los receptores de las ETs en el ojo. Koseki y col. en 1989 detectaron, utilizando técnicas de autorradiografía, receptores de ET en epitelio corneal, iris, cuerpo ciliar, coroides y retina de rata. Nuestro grupo ha caracterizado la presencia de los dos tipos de receptores de ETs, mediante técnicas de unión de radioligandos utilizando análogos específicos, en membranas de la retina neural (De Juan y col., 1993; 1995) y en los procesos ciliares (Rípodas y col., 1998) de la rata. Utilizando técnicas de autorradiografía, McCumber y col. (1994), han localizado los receptores de estos péptidos en las distintas capas de la retina y en la coroides, tanto en el ojo humano como en el de conejo, y han demostrado que el receptor ETA es el más abundante en los vasos retinianos y de la coroides, mientras que los receptores ETB aparecen, en su mayoría, sobre las neuronas y células gliales de la retina. De acuerdo con estos resultados, se ha caracterizado la presencia de receptores de ET-1 en cultivos de células endoteliales de los microvasos de la retina bovina (Takahashi y col., 1989), al igual que en los pericitos retinianos, en los que los receptores son abundantes y en su mayoría de tipo ETA (Ramarchandan y col., 1993).

### **1.4.4 ACTIVIDAD DE LAS ENDOTELINAS EN EL OJO.**

Las ETs se han relacionado con varios procesos fisiológicos en el ojo. Los primeros trabajos realizados para determinar el efecto que las ETs tenían sobre la fisiología ocular (McCumber y col., 1991), ya mostraron que estos péptidos producían una amplia gama de respuestas en este órgano. La inyección intravitreal de ET-1 y ET-3 produce un prolongado descenso de la presión intraocular (PIO), así como contracción del músculo liso de los vasos de la retina, de los procesos ciliares, y del iris en el conejo

(McCumber y col., 1991). Estudios posteriores, sin embargo, muestran un patrón más complejo en el efecto de estos péptidos sobre la PIO; así, Taniguchi y col. (1994) encontraron una respuesta bifásica a la administración intravitreal de ET-1 en el conejo, la respuesta comienza con un incremento seguido de una disminución prolongada en la PIO.

Las ETs también actúan sobre el diámetro de la pupila; *in vitro* producen la contracción de la pupila del conejo, sin embargo *in vivo* provocan la dilatación de la pupila. La ET-3 además, inhibe la respuesta de la pupila a la luz (McCumber y col., 1991).

Los estudios en cultivos celulares demuestran que la ET-1 liberada por las células del endotelio vascular provocan la contracción de los pericitos y su proliferación (Yamagishi y col., 1993). Igualmente, este efecto se ha podido observar en los pericitos de los vasos de la retina (Chakravarthy y col., 1992), cuya contracción y proliferación es estimulada por la ET-1 actuando sobre los receptores ETA. Por otra parte, se ha demostrado, *in vitro* e *in vivo*, que la ET-1 y, en menor medida, la ET-3 producen vasoconstricción de los vasos de la retina de rata y conejo, y mediante el uso de análogos específicos se ha determinado que es el receptor ETA el responsable de la disminución del calibre de los vasos (Takei y col., 1993; Bursell y col., 1995). Al igual que en otros vasos, los vasos de la retina manifiestan una respuesta inicial de relajación, previa a la vasoconstricción, frente a las ETs (Bursell y col., 1995); esta respuesta es mediada por el receptor ETB, situado en las células endoteliales, que produce la liberación de NO y PGI<sub>2</sub> (Namiki y col., 1992).

## 1.5. LAS ENDOTELINAS Y LA DIABETES.

Diversos estudios apuntan la posibilidad de que las ETs puedan estar implicadas en el desarrollo de las complicaciones asociadas a la DM. Algunos trabajos muestran que los niveles de ET-1 en plasma están incrementados en pacientes diabéticos (Takahashi y col., 1990), así como en ratas con diabetes inducida con STZ (Takeda y col., 1991). De acuerdo con estos resultados, se ha comprobado que las arterias mesentéricas aisladas de ratas diabéticas tienen una producción basal de ET-1 significativamente mayor que las aisladas de ratas controles (Takeda y col., 1991). Por el contrario, existen otros estudios

en los que no se detecta ese incremento, ni en humanos (Predel y col., 1990) ni en ratas (Takahashi y col., 1991b). Algunos autores relacionan el incremento de la ET-1 plasmática con la severidad de las alteraciones producidas por la DM, por ejemplo se ha encontrado una correlación positiva entre la ET-1 en plasma y el nivel de albuminuria (como marcador del daño renal), la hipertensión (Haak y col., 1992), o la retinopatía (Kawamura y col., 1992). También, nuestro equipo de trabajo, ha demostrado que en pacientes con DM tipo II que sufren aterosclerosis, los niveles de ET-1 plasmática se encuentran elevados, por lo que la ET-1 podría ser un marcador del daño endotelial (Patiño y col., 1994).

La glucosa altera la secreción de ET-1 por las células endoteliales, ya que en cultivos de células endoteliales de aorta porcina, altas concentraciones de glucosa disminuyen la producción de ET-1 (Hattori y col., 1991), mientras que concentraciones ligeramente inferiores incrementan la secreción de ET-1 en cultivos de células endoteliales de aorta bovina y de células mesangiales de glomérulo (Yamanuchi y col., 1990).

Por otra parte, la insulina estimula la producción de ET-1 en cultivos de células endoteliales de aorta porcina (Hattori y col., 1991), a la vez que incrementa la expresión del ARNm de la ET-1 en cultivos de células endoteliales de aorta bovina (Oliver y col., 1991). Sin embargo, estudios *in vivo* han demostrado que el tratamiento con insulina reduce el efecto vasoconstrictor de la ET-1 sobre la circulación renal, atenuando la respuesta de las células de músculo liso vascular al  $Ca^{2+}$  intracelular (Inishi y col., 1994), y corrige en parte la sobreexpresión del ARNm de la ET-1 en el glomérulo (Fukui y col., 1993) de ratas con diabetes experimental.

La densidad de receptores de las ETs se encuentra alterada en los tejidos de animales con diabetes experimental inducida con STZ. Las membranas de corazón de ratas diabéticas presentan una menor densidad de receptores de ET-1, a los tres días de la inducción de la diabetes con STZ, que las membranas procedentes de ratas controles (Nayler y col., 1989). Por el contrario, en membranas procedentes de la próstata de ratas que se mantuvieron diabéticas ocho semanas se produce un aumento en la densidad de los receptores de ET-1 (Saito y col., 1996a), aunque la proporción de receptores ETA/ETB, determinada usando análogos específicos, se mantiene constante en ambos grupos de animales. En el riñón, en las membranas de los *vasa deferens* de ratas diabéticas también se produce un incremento de la densidad de sitios de unión de ET-1,

respecto del grupo control. Este aumento, es corregido con el tratamiento con insulina (Saito y col., 1996b).

Estos receptores, deben regular importantes procesos durante el desarrollo de las alteraciones asociadas a la diabetes, pues, como han demostrado Nakamura y col. (1996), la sobreexpresión de diversos factores de crecimiento y de proteínas de la matriz extracelular, que se produce durante la diabetes en el riñón, es bloqueada por un inhibidor selectivo del receptor ETA. También el bloqueo de ambos receptores de las ETs con un antagonista no selectivo previene la proteinuria asociada a la nefropatía diabética en la rata (Benigni y col., 1998).

Por último, el efecto fisiológico de las ETs en diversos tejidos se ve alterado como consecuencia de la diabetes experimental; así, en respuesta a la ET-1, en las ratas diabéticas disminuye la contracción de la arteria aorta (Fulton y col., 1991), desciende el flujo sanguíneo en el nervio óptico (Kihara y col., 1995) y en los glomérulos renales (Awazu y col., 1991), se produce un incremento de la deposición de matriz extracelular en la médula renal, o la pérdida de la autorregulación del flujo sanguíneo en los capilares glomerulares (Benigni y col., 1998).

El incremento de la secreción de las ETs, unido a un cambio en el número de sus receptores, junto con la relevante función que esta hormona desempeña en la regulación de distintos procesos fisiológicos, hacen que estos péptidos sean buenos candidatos como mediadores en el desarrollo de las complicaciones asociadas a la DM, tales como la retinopatía, la neuropatía, la nefropatía y las alteraciones macrovasculares.

## **1.6. LAS ENDOTELINAS Y LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.**

### **1.6.1 ORGANIZACIÓN DE LA RETINA Y RETINOPATÍA DIABÉTICA.**

La retina es un tejido que cubre la cara interna de los dos tercios posteriores del globo ocular. Está formada por varias capas de tejido neuronal íntimamente adherido a una monocapa de células epiteliales pigmentarias (Fig. 6).

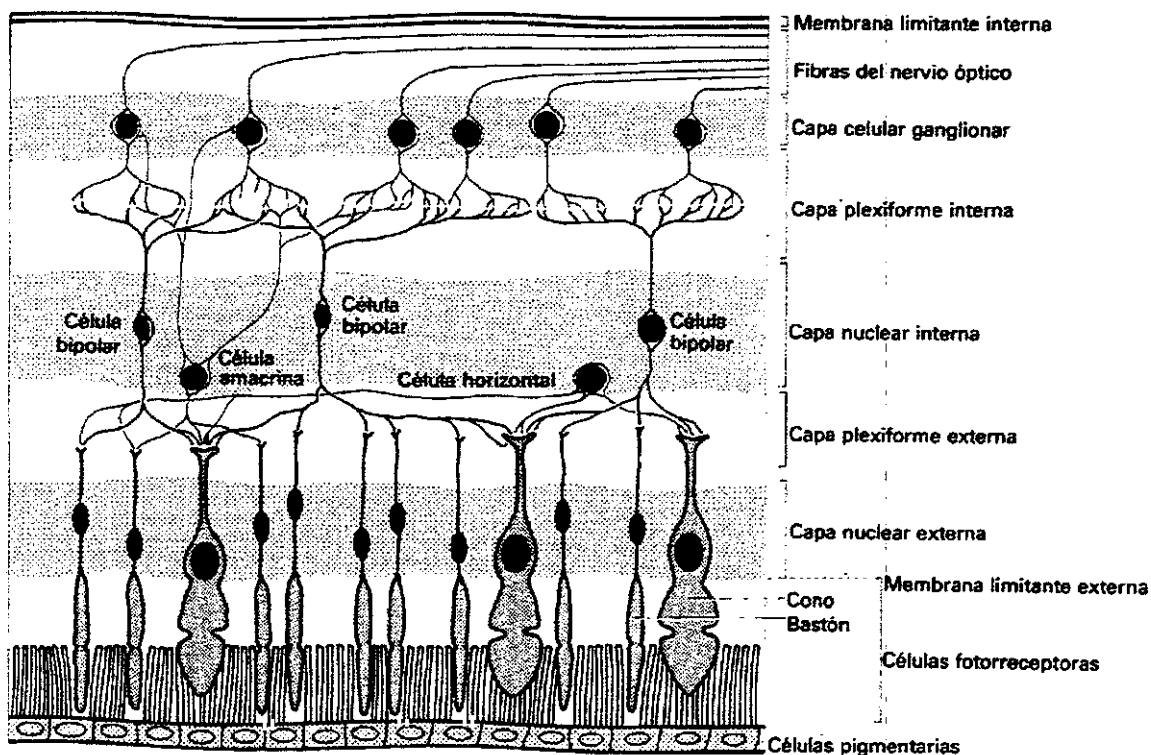


Fig. 6. Dibujo esquemático de las capas de la retina humana (tomado de Wheater y col., en *Histología Funcional*, 1987).

En la retina existen tres tipos de células: las células del epitelio pigmentario, las neuronas y las células de soporte o neurogliales. Histológicamente se suelen distinguir diez capas en la retina. La más externa es la capa de células pigmentarias, que limita con la coroides. La siguiente capa es la de conos y bastones, los fotorreceptores. Una delgada lámina, llamada membrana limitante externa, separa los fotorreceptores de una densa capa de núcleos denominada capa de núcleos externa, que contiene los cuerpos celulares de los conos y bastones. A continuación aparece la capa plexiforme externa donde se sitúan las conexiones sinápticas entre los cortos axones de las células fotorreceptoras y las fibras de las neuronas de conexión (células bipolares, células amacrinas y células horizontales), cuyos cuerpos celulares forman la llamada capa de núcleos interna. La siguiente es la capa plexiforme interna, donde las células de conexión hacen sinapsis con las dendritas de neuronas cuyos cuerpos celulares forman la capa de células ganglionares y cuyos axones se dirigen hacia el nervio óptico, formando la capa



de fibras del nervio óptico. Finalmente la membrana limitante interna separa a la retina del humor vítreo. La distribución de los vasos en la retina es diferente en las distintas especies de animales de investigación. En algunas, como la rata, el cerdo, el ratón, o el mono, existe una densa red de vasos sanguíneos en las capas más internas de la retina, mientras que el cobaya no presenta vasos en el interior de la retina. Un caso intermedio es el conejo que sólo posee vasos en la superficie interna de la retina. En la retina humana, la capa plexiforme externa, la capa de núcleos externa, y la capa de fotorreceptores carecen de vasos sanguíneos. Esta porción de la retina se abastece de capilares de la coroides. Los nutrientes atraviesan el epitelio pigmentario y penetran en los espacios intercelulares de la retina neural externa. Las capas internas de la retina se alimentan de los vasos retinianos, procedentes de la arteria retiniana central que penetra en el globo ocular acompañando al nervio óptico. El entramado capilar derivado de este origen se encuentra en la capa de fibras del nervio óptico y en la capa plexiforme interna, y los vasos penetran hasta la capa de núcleos interna (Engerman y col., 1982; Anderson y col., 1995).

La retina es un tejido con una gran actividad metabólica y, por este motivo, es muy sensible a las disminuciones en el aporte de oxígeno, que provocan en este tejido una acusada alteración funcional. La hipoxia crónica que se produce en algunas patologías como la DM, a consecuencia de la disminución del flujo sanguíneo, desencadena en el ojo y en otros órganos una reacción compensatoria que lleva a la formación de nuevos vasos o angiogénesis. Este mecanismo, que trata de amortiguar los daños funcionales que se producen en el tejido, lejos de solucionar el problema, da lugar en la retina de los individuos diabéticos a una serie de procesos patológicos que constituyen la denominada retinopatía diabética (Guyton, 1989).

En pacientes diabéticos, a partir del momento en que comienzan a observarse anomalías retinianas, la retinopatía diabética evoluciona en dos fases, en función de las lesiones que pueden observarse en la retina. La primera de estas fases se denomina retinopatía diabética no proliferativa y, como describen Aiello y col. (1996), las manifestaciones iniciales de esta patología están relacionadas con una alteración del tono vascular, lo que provoca cambios en el flujo sanguíneo en la retina. Numerosos estudios demuestran que, incluso en los estadios más tempranos de la retinopatía diabética, el flujo sanguíneo retiniano disminuye, aunque otros estudios no detectan ningún cambio (Aiello y col., 1996). En contraste, la mayoría de los trabajos publicados coinciden en

que la autorregulación del flujo sanguíneo en la retina se encuentra alterada, incluso en pacientes diabéticos en los que aún no se detecta ninguna de las anomalías características de la retinopatía (Aiello y col., 1996). Estas alteraciones, a nivel celular, parecen estar relacionadas con la desaparición, en fases muy tempranas de la retinopatía, de los pericitos retinianos, células que actúan como soporte de las células endoteliales. La pérdida de pericitos puede provocar cambios en las células endoteliales a las que están asociadas, que más tarde terminan por originar otras complicaciones, como las alteraciones de la permeabilidad vascular. Con el progreso de la enfermedad, aparece la evidencia clínica de la presencia de retinopatía no proliferativa. Los signos clásicos son: los microaneurismas; las anomalías venosas, descritas como vasos con un calibre irregular y un trazado sinuoso; y los edemas y hemorragias en la retina, que originan exudados de color blanco-amarillento y con forma globular o de anillo. También, durante esta fase, se produce la oclusión de algunos de los vasos sanguíneos, lo que origina isquemia en la retina. El incremento de la isquemia retiniana, puede ser la señal para la producción, por parte de las células, de factores vasoproliferativos que dan lugar a la formación de los nuevos vasos que se observan en la segunda fase de la enfermedad.

La segunda fase se denomina retinopatía diabética proliferativa y se caracteriza por el desarrollo de lesiones severas de la retina relacionadas con la proliferación celular. En esta fase, se produce la activa formación de nuevos vasos en la superficie de la retina, que comienza con la formación de ramificaciones en forma de horquilla o de lazo de los vasos preexistentes. La neovascularización de la retina ocurre con mayor frecuencia en los vasos temporales y en el disco óptico. Los nuevos vasos carecen de recubrimiento de tejido conectivo y frecuentemente originan hemorragias en el límite entre la retina y el humor vítreo. Estas hemorragias provocan, a menudo, la pérdida de agudeza visual (Aiello y col., 1996). Los vasos anómalos se extienden con frecuencia por el interior de la retina y el humor vítreo. Otra alteración característica de esta fase es la proliferación glial, que conlleva la aparición de células gliales alrededor de los vasos de nueva formación, aunque también se produce en zonas sin neovascularización (Aiello y col., 1996). El tejido glial que acompaña a los nuevos vasos puede contraerse y provocar la tracción de la retina. Esta tracción puede alterar la arquitectura de la retina, y provocar hemorragias en el humor vítreo y desprendimiento de retina. En las fases finales, muy severas, de la retinopatía diabética este nuevo tejido fibrovascular provoca un completo desprendimiento de la retina, contrayendo la retina en una configuración con forma de

embudo alrededor de la mácula. Si no se tratan estas complicaciones provocan una severa, e incluso total, pérdida de visión (Aiello y col., 1996).

Un objetivo primordial, en el campo de la investigación de la DM y sus complicaciones, es reproducir en animales de experimentación las lesiones características de los vasos retinianos que se producen en la DM humana, para poder clarificar las causas y el origen de la retinopatía y ensayar posibles métodos de tratamiento. Se han diseñado varios modelos experimentales en animales de laboratorio que intentan reproducir las alteraciones vasculares encontradas en la retina de los pacientes diabéticos. Sin embargo, aunque muchas de las lesiones que se observan en la retina humana pueden reproducirse en diversos modelos experimentales, a la hora de extrapolar los resultados, debe considerarse la diferente estructura anatómica del ojo en las diferentes especies, y comprobar que las alteraciones observadas son, efectivamente, las mismas que las que se producen en los humanos diabéticos. Uno de los modelos más utilizado es el obtenido al administrar STZ a ratas y otros pequeños animales de laboratorio, como ratón o hámster. En la diabetes inducida en la rata mediante la inyección de STZ, se producen lesiones similares a las que se desarrollan en humanos durante la retinopatía no proliferativa, como microaneurismas (Leuenberger y col., 1971), vasodilatación venosa (Sosula y col., 1972), disminución del número de pericitos y cambios en la membrana basal de los vasos (Cunha-Vaz y col., 1975). Sin embargo, en ningún caso se ha descrito el desarrollo de neovascularización en la retina de ratas diabéticas (Engerman y col., 1982). Esto podría ser debido a que las ratas diabéticas no viven lo suficiente para desarrollar la retinopatía proliferativa (Hammes y col., 1998), aunque también se ha sugerido que pueden existir factores antiangiogénicos en la retina de las ratas adultas, que evitan la neovascularización, ya que, en la retina de ratas recién nacidas sometidas a condiciones de hipoxia, sí se produce neovascularización (Reynaud y col., 1994).

La retinopatía proliferativa se puede reproducir de forma experimental en perros y monos. En estos animales, tras periodos de hiperglucemia superiores a los tres años, se produce neovascularización principalmente en el interior de la retina, más que en la superficie o en el humor vítreo como ocurre en humanos (Engerman y col., 1965; Bresnick y col., 1976).

En la actualidad, la secuencia de acontecimientos que ocurren en la retina diabética es parcialmente desconocida y aún no se han determinado las relaciones causa-efecto de muchos de los procesos que en ella tienen lugar. Por otra parte, se trata de un

campo de la investigación en el que se están haciendo grandes esfuerzos, puesto que los estudios clínicos demuestran que el porcentaje de pacientes diabéticos que desarrollan retinopatía, aumenta proporcionalmente con el tiempo de duración de la enfermedad, y que tras 15 años de padecer la DM, prácticamente el 100 % de los individuos diabéticos desarrolla esta patología en alguna de sus fases (L'Esperance y col., 1983; Aiello y col., 1996).

### **1.6.2 LESIONES VASCULARES EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.**

A nivel celular, dos cambios importantes tienen lugar en la pared de los microvasos retinianos durante la DM. Por una parte, se produce una disminución en el número de las células que forman los vasos sanguíneos, especialmente hay una disminución en el número de pericitos (Cogan y col., 1961), unas células de origen mesodérmico que están adosadas a la membrana basal de los capilares, y que rodean a las células endoteliales que forman la pared de estos vasos. Los pericitos tienen capacidad para contraerse por lo que se considera que su principal función es controlar el calibre de los capilares. Si en los vasos sanos la proporción de pericitos frente a células endoteliales es 1:1, en los individuos diabéticos se detecta una disminución de la proporción de pericitos en fases tempranas de la DM. La posterior desaparición de las células endoteliales de los vasos, en el curso de la enfermedad, da lugar a la formación de los llamados capilares acelulares (Ashton, 1963), que tienen una función capital en la evolución de la retinopatía, pues en ellos el riego sanguíneo está dificultado y, donde se originan, se produce isquemia y neovascularización.

No está suficientemente claro si la desaparición de las células de los capilares retinianos es una consecuencia o la causa de la oclusión de los capilares que da lugar a la isquemia de la retina. Existen datos que sugieren que la desaparición de los pericitos es una consecuencia de la isquemia retiniana puesto que, en los microvasos del nervio óptico y de la corteza cerebral, la pérdida de pericitos a consecuencia de la DM no se produce, o al menos no es tan rápida como en la retina. Estos hallazgos sugieren que la desaparición de los pericitos se debe a cambios locales en la retina, probablemente de tipo hemodinámico (Engerman, 1989). En contraposición, existen indicios de que la

disminución de los pericitos no se produce a consecuencia de los cambios en la circulación retiniana (Lorenzi y col., 1991): en primer lugar, los pericitos no están en contacto directo con la luz de los vasos, sino que se sitúan rodeando a las células endoteliales, por lo que están más alejados de la luz del vaso que las células endoteliales que, sin embargo, resisten mejor las alteraciones metabólicas de la DM; en segundo lugar, la pérdida de pericitos se sigue produciendo incluso después del tratamiento de los pacientes diabéticos, cuando las alteraciones circulatorias se han corregido. En este sentido, se ha propuesto que la DM altera la actividad mitogénica de las células endoteliales y los pericitos de los capilares, y que su desaparición podría ser debida, por una parte, al efecto tóxico del metabolismo alterado por la diabetes y, por otra, a la pérdida de la capacidad de división de estas células (Lorenzi y col., 1991).

La segunda alteración histológica que se produce, como consecuencia de la DM, es el engrosamiento de la membrana basal de los capilares de la retina, producida por las alteraciones en el proceso de síntesis y degradación de sus componentes, especialmente en lo que se refiere a la degradación de las proteínas, dificultada porque éstas sufren una glicosilación no enzimática en la DM, y porque disminuye la producción de las enzimas encargadas de su degradación (Nyengaard y col., 1997). Esta alteración se ha observado en los capilares de la capa de fibras nerviosas, la capa plexiforme interna y la capa plexiforme externa, que son las capas vasculares de la retina de rata (Anderson y col., 1995).

### **1.6.3 ALTERACIÓN DE LA BARRERA HEMATORRETINIANA**

El concepto de barrera hematorretiniana es análogo al de barrera hematoencefálica. Los vasos retinianos presentan una elevada impermeabilidad, similar a la que presentan los vasos que riegan el sistema nervioso central, que es muy superior a la de los vasos de otras regiones del cuerpo. La barrera hematorretiniana se localiza a dos niveles: existe una barrera externa formada por el epitelio pigmentario de la retina que aísla a la retina de los vasos de la coroides, y una barrera interna formada por las células endoteliales de los vasos de las capas más internas de la retina (Cunha-Vaz y col., 1966). La alteración de la barrera hematorretiniana, con un aumento de su permeabilidad, ha sido establecida como uno de los eventos fisiopatológicos más

tempranos que tienen lugar en la retina de individuos diabéticos. Este incremento de la permeabilidad se ha demostrado usando técnicas de angiografía con fluoresceína en humanos (Cunha-Vaz y col., 1975) y en ratas tratadas con STZ (Waltman y col., 1978). De acuerdo con estos resultados, Ishibashi y col. (1979) han descrito los cambios ultraestructurales que se producen en las células endoteliales de los capilares de la retina como consecuencia de la DM, demostrando que un mes después de la inducción de la diabetes con STZ, las uniones intercelulares de las células endoteliales comienzan a alterarse, permitiendo la salida desde los vasos del marcador utilizado. Estas alteraciones son anteriores al engrosamiento de la membrana basal de los capilares y a la disminución del número de los pericitos, que marcan el comienzo de la angiogénesis en la retinopatía diabética.

Estos cambios en la permeabilidad de la barrera hematorretiniana se han relacionado con las altas concentraciones de glucosa plasmática mediante varios mecanismos, como la alteración de las rutas metabólicas de la degradación de la glucosa (Winegrad y col., 1986) o la alteración de la presión osmótica (Kaneko y col., 1990), pero también parecen estar implicados en estos procesos algunos factores de crecimiento y hormonas que resultan alterados por la DM y que se sabe que actúan sobre las células endoteliales.

#### **1.6.4 FACTORES DE CRECIMIENTO IMPLICADOS EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA**

Profundos cambios bioquímicos deben preceder a los cambios fisiopatológicos y morfológicos que tienen lugar en los vasos durante la retinopatía diabética, y existen múltiples hipótesis que relacionan estas alteraciones con toda una serie de factores vasoactivos y factores de crecimiento. La primera de estas hipótesis fue la enunciada por Michaelson en 1948, según la cual, la retina neural, ante la hipoxia producida por la isquemia, libera un factor angiogénico responsable de la retinopatía proliferativa.

En la actualidad, todavía se sigue investigando la naturaleza de ese factor y los mecanismos por los que se altera su producción, sin que se haya llegado a tener una idea clara de su origen y su mecanismo de acción. La primera hormona a la que se atribuyó la responsabilidad de la proliferación vascular en la retina fue a la hormona de crecimiento

(GH), debido a que se comprobó que la extirpación de la hipófisis provocaba una mejoría en la retinopatía proliferativa (Lundbaek y col., 1970), aunque esta hipótesis se desechó ante la demostración de que es la propia retina la que produce los factores responsables del crecimiento de nuevos vasos (Glaser y col., 1980). Igualmente, se ha sugerido la intervención del factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-I), que se encuentra elevado en el humor vítreo de pacientes con retinopatía proliferativa (Grant y col., 1986), y que en la retina de conejo actúa como un agente angiogénico (Grant y col., 1993). También ejercen una potente acción vasoproliferativa (Gospodarowicz, 1991), los factores de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (aFGF y bFGF), que además han sido detectados en la retina de individuos que presentan retinopatía (Reygrobellet y col., 1991). En los últimos años, se ha desarrollado una intensa actividad investigadora sobre la acción angiogénica de los miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Estos péptidos poseen unas características que les señalan como mediadores de primera magnitud en la retinopatía diabética puesto que: incrementan la permeabilidad de los capilares (Keck y col., 1989), su producción se eleva en situaciones de hipoxia (Ferrara y col., 1992), su presencia aumenta en el humor vítreo y acuoso de pacientes con distintos grados de retinopatía (Aiello y col., 1994), y por último, presentan abundantes receptores en las células endoteliales (Thieme y col., 1995), sobre las que tienen una actividad mitogénica muy específica (Dvorak y col., 1995). A su vez, se ha señalado que los inhibidores de la angiogénesis deben desempeñar una función importante en la regulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos. Aunque en este campo de investigación se ha trabajado mucho menos que en el de los activadores, se ha descrito la inhibición de la proliferación de las células endoteliales por pericitos en cocultivo, y que este efecto, es mediado por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Antonelli-Orlidge y col., 1989), sugiriendo que el proceso de la neovascularización es el resultado de la pérdida del equilibrio entre factores activadores e inhibidores de la angiogénesis. Es posible que estos factores de crecimiento no actúen en una fase temprana de la retinopatía ni sean los responsables de la hipoxia y de los daños en la retina, sino que son liberados en respuesta a las perturbaciones que originan esta patología, con la función de generar nuevos vasos que reduzcan la situación de hipoxia en las partes afectadas de la retina. Además, es muy posible, que existan otros factores de crecimiento implicados en estos procesos que aún no han sido investigados lo suficiente, pero que en el futuro pueden arrojar nueva luz sobre este tema.

## 1.6.5 IMPLICACIÓN DE LAS ENDOTELINAS EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.

Los datos de los que disponemos en la actualidad indican que las ETs no sólo tienen una importante función en la regulación del funcionamiento normal de la retina, sino que también actúan a distintos niveles en el desarrollo de la retinopatía diabética.

Estudios *in vivo* demuestran que la inyección intravítrea de ET-1 provoca vasoconstricción en los vasos de la retina de conejo (Takei y col., 1993), actuando, principalmente, sobre los receptores ETA. Por otra parte, estudios *in vitro* demuestran que las células del endotelio vascular de la retina producen ET-1, y que existen receptores ETA en los pericitos retinianos (Takahashi y col., 1989), indicando que también los microvasos deben responder a la ET-1. Por otro lado, existen datos que sugieren que el efecto de las ETs sobre los vasos de la retina es muy sensible a los cambios metabólicos producidos durante la DM. En este sentido, se ha demostrado en los pericitos la disminución de la capacidad de la ET-1 para activar la PKC cuando se cultivan en presencia de una elevada concentración de glucosa (De la Rubia y col., 1992), aunque no se detecta ningún cambio en la afinidad o el número de receptores. Si este proceso tuviese lugar *in vivo*, podría estar implicado en la dilatación capilar y otras disfunciones que se producen en las primeras fases de la retinopatía diabética. De acuerdo con estos datos, Bursell y col. (1995) han mostrado que el efecto vasoconstrictor de la ET-1 en la retina de ratas diabéticas es 10 veces menor en comparación con el observado en las ratas controles. También es conocido que las células endoteliales en cultivo incrementan la producción de ET-1 en presencia de altas concentraciones de glucosa (Yamanuchi y col., 1990; Chakravarthy y col., 1997), lo que sugiere que, en las primeras fases de la DM, las elevadas concentraciones de glucosa deben provocar una vasoconstricción inicial, debida al incremento de la secreción de ET-1, seguida de una pérdida de la capacidad de los pericitos para responder a ET-1, lo que iría acompañado de vasodilatación, especialmente si la elevada concentración de ET-1 provoca en los pericitos una disminución del número de receptores de ET-1 (Ramarchandan y col., 1993).

Otro hallazgo importante es que las ETs aumentan la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Filep y col., 1991) y, aunque no aparece en la bibliografía ningún estudio



realizado en los vasos retinianos, ni existen datos que reflejen si esta función de las ETs se ve alterada en animales diabéticos, existe la posibilidad de que estos péptidos estén implicados en la alteración de la barrera hematorretiniana que se produce en la DM. Por otra parte, se ha demostrado que la insulina incrementa la síntesis y la liberación de ET-1 por las células endoteliales (Hu y col., 1993, Chakravarthy y col., 1997), así como la expresión de sus receptores en los pericitos y células de músculo liso vascular (Frank y col., 1993; McDonald y col., 1995), lo que podría estar relacionado con la continuación y el agravamiento de la retinopatía diabética en los pacientes tratados con insulina.

Otro interesante campo de estudio es el efecto de la DM sobre la retina neural. En este sentido, es interesante señalar que las células gliales de la retina tienen una importante función en la génesis de las alteraciones hemodinámicas que se producen en la retinopatía en pacientes humanos ya que, recientemente, se han puesto de manifiesto alteraciones en el funcionamiento de las células de Müller de pacientes diabéticos (Mizutani y col., 1998), y es conocido que dichas células liberan factores que regulan el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y la supervivencia de las neuronas en la retina (Newman y col., 1996). Por otra parte, se ha podido demostrar que el material que ocluye los vasos sanguíneos de la retina en la DM es de origen glial, lo que indica que la proliferación de estas células está directamente implicada en las alteraciones del flujo retiniano (Toke, 1997). La hipoxia o las alteraciones metabólicas que sufre la retina generan alteraciones del funcionamiento normal de las células nerviosas o gliales, lo cual, en referencia al sistema de las ETs, podría suponer un cambio en la síntesis de estos péptidos, o bien en el número, la proporción, o la distribución de sus receptores, que están presentes en estas células (Battistini y col., 1993; Ehrenreich y col., 1991). Estos péptidos, actuando sobre sus receptores, funcionan como neuromoduladores en el sistema nervioso, y podrían tener una importante función en la fisiopatología de la retinopatía diabética.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS.

El objetivo global de esta tesis es avanzar en el conocimiento de las características bioquímicas y de la regulación de los receptores de endotelina en la retina de la rata, y de las posibles alteraciones que en la densidad y la proporción de dichos receptores pueden producirse como consecuencia de la diabetes y de su tratamiento.

Específicamente, utilizando como material biológico los tejidos procedentes de tres grupos de animales (ratas con diabetes inducida con STZ, ratas con diabetes inducida con STZ tratadas con insulina, y ratas controles), nos propusimos abordar el estudio de los siguientes aspectos:

1- Determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) y de la densidad de sitios de unión ( $B_{max}$ ) de la ET-1 y la ET-3 en la retina neural de rata a los 15, 45, y 90 días de la inducción de la diabetes con STZ y comparación de estos parámetros entre los tres grupos de animales.

2- Determinación de la proporción de los dos tipos de sitios de unión de las ETs presentes en la retina neural de rata a los 15, 45, y 90 días tras la inducción de la diabetes con STZ y comparación de los resultados entre los tres grupos de animales.

3- Determinación del peso molecular de los sitios de unión de la ET-1 y de la ET-3 presentes en las membranas de retina de rata, en los tres grupos de animales, a los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ.

4- Determinación de la distribución de los sitios de unión de las ETs en las distintas capas de la retina de las rata y comparación de esta distribución entre los tres grupos de animales a los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ.

5- Determinación de la distribución de la ET-1-IR en la retina de los tres grupos de animales, a los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. APARATOS Y REACTIVOS.

#### 3.1.1 APARATOS.

Para homogeneizar el tejido se utilizan homogeneizadores cónicos de cristal de 15 ml.

Las centrifugaciones realizadas para la preparación de membranas se realizan en una centrífuga Minifuge T de Heraeus y una ultracentrífuga Sorvall RC-5C de Dupont.

La valoración de proteínas se realiza midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro Pye Unicam SP6-550 UV/VIS de Phillips.

Para realizar las electroforesis se utiliza una fuente de alimentación LINUS modelo 3540 conectada a una cubeta de electroforesis tipo "precast gel system mini-cell" también de LINUS.

Los geles utilizados en la electroforesis fueron minigeles de Tris/glicina con un 10% de poliacrilamida suministrados ya polimerizados por Linus (minigel EC6015 10 well de 1.0 mm de LINUS), con una zona de concentración de 1 cm.

Para hacer los cortes histológicos en congelación se utilizó un criostato modelo HM505E de Microm.

La determinación de la glucemia se realizó con un glucosímetro de tiras reactivas One Touch II de Lifescan.

Los portaobjetos viselados, limpios y desengrasados se obtuvieron de Hirschmann Laborgerate.

Las preparaciones histológicas se analizaron y fotografiaron con un microscopio Photomicroscope III de Zeiss con condensador de campo oscuro y campo claro.

Para digitalizar los negativos de las imágenes de microautorradiografía se utiliza un escáner tipo LKB Image Master de Pharmacia.

Para el análisis de los resultados de los experimentos de unión de la endotelina a sus receptores en las membranas de retina se utilizan los programas EBDA y LIGAND de G.A. MacPherson (Elsevier-BIOSOFT).

El análisis densitométrico de las microautorradiografías y las electroforesis se realiza con el programa Image Master versión 1.0 de Pharmacia.

Para analizar los resultados de los experimentos de inmunohistoquímica usamos la aplicación informática Leica Qwin (Leica microscopy systems Ltd.) y una videocámara digital (Leica DC100) montada sobre un microscopio y conectada a un ordenador

personal.

Para el análisis estadístico de los resultados se utiliza el programa informático SPSS para Windows versión 6.0.

### 3.1.2 REACTIVOS.

Las hormonas marcadas con Iodo 125 [<sup>125</sup>I] utilizadas en los ensayos son la Endotelina-1 y la Endotelina-3, se obtuvieron de Amersham International y poseen una actividad específica de 2000 Ci/mmol.

Los péptidos Endotelina-1, Endotelina-3, BQ123 (ciclo-(D-Asp-Pro-D-Val-Leu-D-Trp), y Sarafotoxina 6 c (S6c), además del antisuero de conejo anti-endotelina-1 utilizado en el RIA, se obtuvieron de Peninsula Laboratories.

Las ratas se trataron con la insulina Lente (bovina/porcina) generosamente donada por Novo-Nordisk.

Los filtros Whatman GF/C, utilizados para la filtración, se obtuvieron de Whatman International, y el sistema de vacío utilizado para filtrar las membranas celulares es el Vacuum Manifold (modelo 1225) de Millipore.

El Tris-HCl (Trizma hidrocloreto), Tris-base (Trizma base), inhibidores de la proteólisis (aprotinina, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), pepstatina), la bacitracina, la albúmina de suero bovino (BSA), glicina, sodio dodecil sulfato (SDS), paraformaldehído, glutaraldehído, poli-L-Lisina (PLL), streptozotocina (STZ) y dimetil sulfóxido (DMSO) se consiguieron de Sigma Chemical Co. El ácido acético, carbonato sódico, hidróxido sódico, tartrato disódico, sulfato cúprico, el reactivo de Folin, tampón HEPES, acetato amónico, citrato sódico, benzoato sódico, ácido benzoico, sacarosa, cloruro sódico, cloruro magnésico, etanol, 2-metil butano y EDTA de E. Merck.

El dissuccinimidil suberato (DSS) y el azul de Coomassie se compraron a Pierce Chemical Co..

Las proteínas que se utilizan para hacer la curva patrón para calcular el peso molecular en la electroforesis son de BIO-RAD (SDS-PAGE High Molecular Weight Standards).

Las columnas tipo Sep-Pack C-18 para la extracción de la Endotelina-1 en el RIA son de Waters Associates.

La película de rayos X utilizada para la autorradiografía de los geles de la electroforesis

fue la XR-OMAT RP6 de Kodak.

En microautorradiografía se usó la emulsión fotográfica LM1 de Amersham International. El revelador usado es el D-19 de Kodak y el fijador utilizado fue Hypam de Ilford limited.

El medio de inclusión utilizado para cortar el tejido en congelación es Tissue Tek, de Miles Inc.

En el análisis inmunohisquímico se utilizó un antisuero de conejo contra el antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación humano (PU016-PU) de BioGenex, un antisuero de conejo contra ET-1 de Peninsula Laboratories y el equipo de revelado "super-sensitive ready-to-use (AD000-5R)" también de BioGenex.

## **3.2. ANIMALES.**

### **3.2.1 CONDICIONES GENERALES.**

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la directiva del Consejo Europeo del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/CEE). Se utilizan ratas macho Wistar. Los animales se disponen en jaulas de policarbonato de 1800 cm<sup>2</sup> y 20 cm de altura, en grupos de cuatro, en salas con la temperatura y la humedad controlada y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Se alimentan con comida estandarizada comercial y agua *ad libitum*.

### **3.2.2. PAUTAS DE TRATAMIENTO.**

#### **3.2.2.1 ADMINISTRACIÓN DE LA STREPTOZOTOCINA.**

La streptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureido) D-glucopiranosa) es un antibiótico de amplio espectro y un agente antitumoral que produce el desarrollo de la diabetes en ratas y otros animales de experimentación (Rakieten y col., 1963). Su capacidad para producir la diabetes está relacionada con su toxicidad sobre las células  $\beta$  del páncreas. Uno de sus componentes, la nitrosourea, es citotóxico, mientras que la desoxiglucosa facilita la entrada del compuesto en las células pancreáticas. Desde su aislamiento y purificación este compuesto ha sido ampliamente utilizado en la inducción

de la diabetes experimental.

En nuestros experimentos, la STZ se utiliza disuelta en tampón citrato 10 mM a pH 4.5, que contiene NaCl 100 mM, en una dosis de 75 mg/Kg de peso del animal. La administración se realiza por vía intraperitoneal cuando las ratas alcanzan un peso de 200 grs aproximadamente.

### **3.2.2.2 ADMINISTRACIÓN DE LA INSULINA.**

El tratamiento con insulina (Lente (bovina/porcina) de Novo-Nordisk) se inicia a partir de las 48 horas del tratamiento con STZ, tras comprobar que los animales presentan glucosuria y glucemia superior a 450 mg/dl. A los animales se les inyecta diariamente, por vía subcutánea, una dosis de entre 3 y 6 U.I. de insulina, en función de su peso y su glucemia, para mantenerles la glucemia entre 120 y 150 mg/dl. La inyección de la insulina se realiza a las 10.00 h. Se realizaron experimentos previos que sirvieron para elegir el tipo más adecuado de insulina y las dosis necesarias para mantener la glucemia entre 120 y 150 mg/dl.

### **3.2.3 ESTUDIO EVOLUTIVO.**

A todos los animales se les pesa y se les mide la glucemia tres veces cada semana, durante los primeros 15 días del experimento y dos veces cada semana el resto del tiempo. La sangre para valorar la glucemia se obtuvo mediante punción en la vena tarsal de cada animal y la glucosa en sangre se calcula utilizando un glucosímetro de tiras reactivas. Este proceso se realiza a primera hora de la mañana, inmediatamente antes de inyectarles a los animales su dosis diaria de insulina.

### **3.2.4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS.**

#### **3.2.4.1 SACRIFICIO DE LOS ANIMALES.**

El sacrificio de los animales, para la obtención de las muestras objeto de estudio, se realiza por decapitación, sin utilizar anestesia, práctica admitida para esta especie por



la DGXI de la Comisión Europea, Directiva 86/609/EEC, referido especialmente en el artículo 2 (1) y publicado por esta Comisión en Octubre de 1995.

#### **3.2.4.2 PLASMAS.**

Tras el sacrificio de los animales, aproximadamente 10 ml de sangre de cada animal se recolecta en tubos de 15 ml a los que previamente se les había añadido 100  $\mu$ l de EDTA 3 mM, y 100  $\mu$ l de aprotinina 0.8 mM. Los tubos se introducen en hielo hasta su centrifugación. La sangre se centrifuga a 1000 xg a 4°C durante 15 minutos. A continuación se extrae el plasma y se distribuye en dos alícuotas que se congelan a -80 °C hasta su utilización en un periodo máximo de tres meses.

#### **3.2.4.3 DISECCIÓN DE LAS RETINAS.**

Tras la decapitación de los animales, se procede a la enucleación de los ojos que se mantienen en suero fisiológico frío hasta su disección. La disección de los ojos se realiza de forma inmediata sobre una placa fría y bajo una lupa de disección (30X). Durante la disección se elimina primero la córnea, seguida del cristalino y el cuerpo vítreo, para luego extraer la retina con un pincel y depositarla en un homogeneizador al que previamente se han añadido 200  $\mu$ l de tampón Tris 5mM a pH 7.4, con sacarosa 0.32 M, pepstatina 0.2 mM, PMSF 0.5 mM y aprotinina 0.8 mM.

#### **3.2.4.4 PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS CELULARES DE RETINA.**

Las retinas de tres ratas (n=6), recién diseccionadas, se homogeneizan juntas, durante 1 minuto, en frío, en el homogeneizador cónico con 200  $\mu$ l de tampón (Tris 5mM pH 7.4, sacarosa 0.32 M, pepstatina 0.2 mM, PMSF 0.5 mM y aprotinina 0.8 mM) y se centrifugan durante 15 minutos a 4°C a 600 xg (Fig. 7). El precipitado se incluye en Tissue-Tek y se congela a -70°C, para realizar el análisis inmunohistoquímico de la presencia del antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación. El sobrenadante se vuelve a centrifugar durante 30 minutos a 4°C y a 30.000 xg. A continuación, el precipitado se resuspende en el mismo tampón y se centrifuga en las mismas condiciones

para lavar las membranas celulares de retina. El precipitado de esta última centrifugación se resuspende en tampón Tris 50 mM pH 7.4 para obtener una concentración de proteínas de 0.75-1 mg/ml. Después se hacen alícuotas de 0.5 ml que se guardan a -70 °C hasta ser utilizados en los experimentos.

Se reserva un pequeño volumen para la valoración de la concentración de proteínas que se determina por el método de Lowry y col. (1951). La fracción del tejido que se consigue mediante el proceso que acabamos de describir, y al que denominaremos “membranas celulares de retina” a partir de este punto, está enriquecido en la fracción microsomal de células neuronales y gliales como demuestran los trabajos de Zhaniser y col., (1984) y no presenta contaminación vascular.

Una de estas alícuotas se vuelve a centrifugar a 30.000 xg y el precipitado se incluye en Tissue-Tek y se congela a -70°C para realizar secciones con el criostato sobre las que analizar la presencia del antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación.

#### **3.2.4.5 CONGELACIÓN DE LOS OJOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS SECCIONES CON EL CRIOSTATO.**

Tras su enucleación, cada uno de los ojos elegidos para este fin, se introduce en un recipiente semiesférico de plástico que contiene el medio de inclusión Tissue Tek, y rápidamente se congelan en 2-metilbutano previamente enfriado en nitrógeno líquido. Los ojos así preparados se guardan a -70° hasta su utilización en un periodo máximo de 3 meses.

#### **3.2.4.6. REALIZACIÓN DE LAS SECCIONES CON EL CRIOSTATO.**

##### **3.2.4.6.1 PREPARACIÓN DE PORTAOBJETOS CON POLI-L-LISINA.**

Se disuelve la poli-L-Lisina (PLL) en agua destilada a una concentración de 1 mg/ml y se hacen alícuotas que se guardan a -20°C. Sobre los portaobjetos limpios y desengrasados se coloca una gota de 10 µl de la solución de PLL y se extiende en una delgada lámina sobre toda su superficie, superponiendo dos portaobjetos y luego dejándolos secar por separado. Una vez secos los portaobjetos se guardan a -20°C hasta su uso.

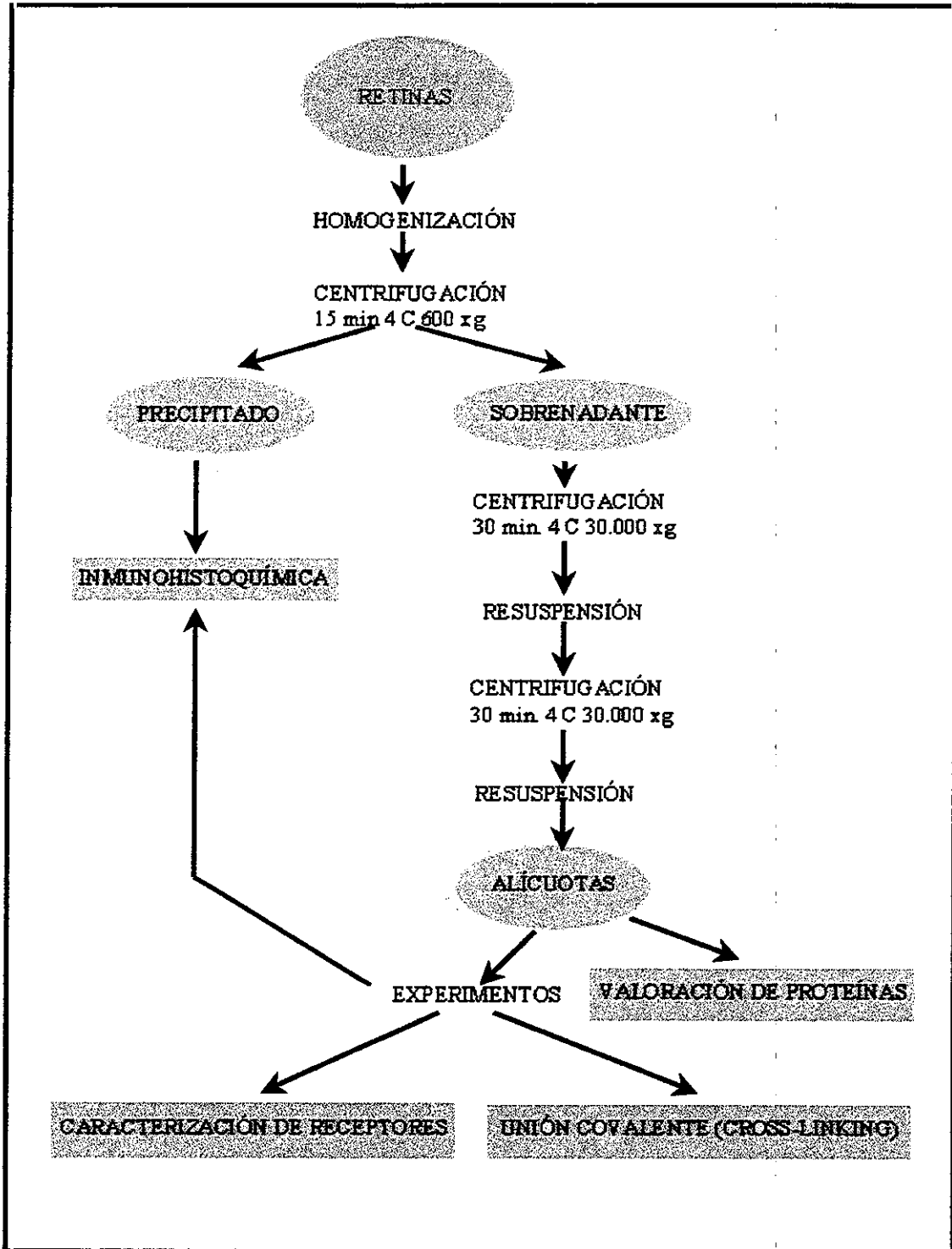


Fig. 7. Preparación de las membranas de retina de rata.

### 3.2.4.6.2 REALIZACIÓN DE LAS SECCIONES CON EL CRIOSTATO.

En el momento de hacer las secciones, los ojos incluidos en Tissue-Tek se extraen de los recipientes semiesféricos y se fijan sobre la platina del criostato, de manera que la cuchilla realice secciones sagitales del ojo a la altura de la entrada del nervio óptico en el globo ocular. Se realizan secciones de 12  $\mu\text{m}$  a  $-30^{\circ}\text{C}$  en series de 30-35 cortes consecutivos y se seleccionan las series que contienen la zona de la retina adyacente al nervio óptico. Las secciones se montan en portaobjetos, previamente recubiertos con PLL, a una temperatura de  $0-2^{\circ}\text{C}$ , a continuación se secan a  $4^{\circ}\text{C}$  en vacío durante 3 horas y luego se congelan a  $-70^{\circ}\text{C}$ , en cajas que contienen gel de sílice, hasta su utilización en los experimentos de inmunohistoquímica y microautorradiografía.

Con el precipitado de las centrifugaciones de la preparación de membranas, una vez incluido en Tissue-Tek, se procede de manera análoga a la descrita en el párrafo anterior, para conseguir secciones en las que realizar el análisis inmunohistoquímico de la presencia del antígeno relacionado con el Factor VIII de coagulación

## 3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Un total de 140 ratas Wistar con un peso de, aproximadamente, 200 g se tratan y se distribuyen en grupos de la siguiente manera (Fig. 8):

A 100 de estos animales se les inyecta, por vía intraperitoneal, una dosis de 75 mg/Kg de STZ diluida en tampón citrato 10 mM a pH 4.5 con NaCl 100 mM, para inducirles la diabetes. A las 48 horas del tratamiento con STZ se selecciona a las que presentaban glucosuria con glucemia superior a 450 mg/dl ( $n=80$ ) y se desprecia a aquellas que no cumplen estas condiciones ( $n=20$ ). Los animales que desarrollan diabetes se dividen entonces en dos grupos:

Un primer grupo ( $n = 40$ ) al que llamaremos “grupo de ratas diabéticas” (GD) se mantiene sin ningún tipo de tratamiento durante el resto del experimento.

Un segundo grupo ( $n=40$ ) al que llamaremos “grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina” (GT), durante el resto del experimento, recibe diariamente una dosis de entre 3 y 6 U.I. de insulina.

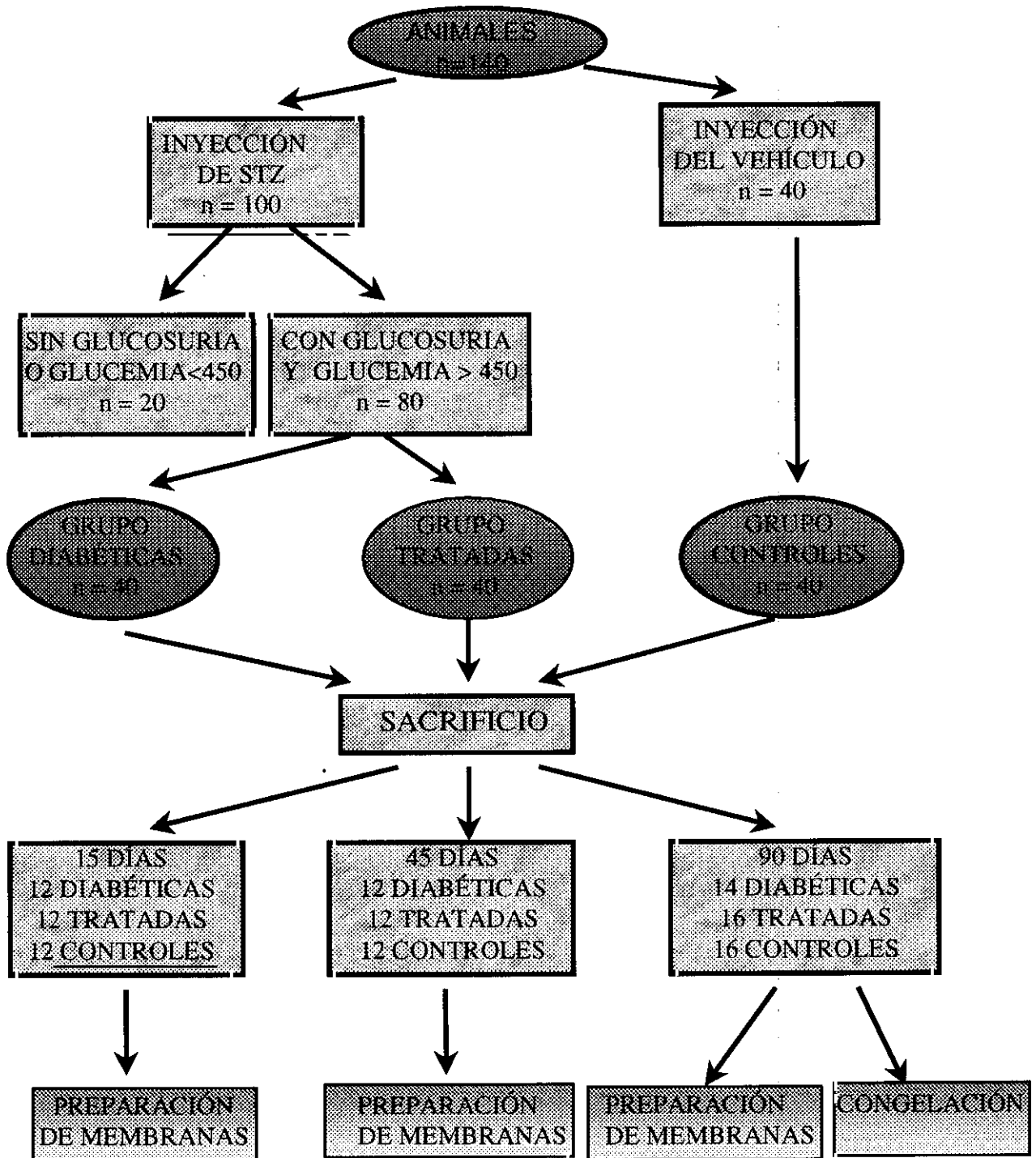


Fig. 8. Diseño experimental.

Con los 40 animales restantes, se constituye un tercer grupo al que llamaremos “grupo de ratas controles” (GC) al que se inyecta, al comienzo del experimento y por la misma vía, el volumen correspondiente a su peso de tampón citrato a pH 4.5 con NaCl 100 mM.

Los animales se sacrifican transcurridos 15, 45, y 90 días después del tratamiento con STZ, de la siguiente manera:

-A los 15 días se sacrifican 12 ratas de cada uno de los tres grupos. Se les extrae la sangre y los ojos son utilizados para preparar membranas de retina.

-A los 45 días se sacrifican otras 12 ratas de cada uno de los tres grupos. Se les extrae la sangre y los ojos son utilizados para preparar membranas de retina.

-A los 90 días se sacrifica el resto de los animales, que fueron 16 del GC, 16 del GT y 14 del GD, en este último grupo 2 ratas murieron durante el experimento. Se les extrae la sangre y sus ojos se utilizan de la siguiente manera:

.Los ojos de 12 ratas de cada uno de los tres grupos se utilizaron para preparar membranas de retina.

.Los ojos de 4 ratas del GC y del GT y de 2 ratas del GD se congelaron para realizar cortes histológicos con el criostato.

Los animales a los que se inyecta STZ y que no desarrollan diabetes se emplean, mediante su comparación con el grupo control, para comprobar que la STZ *per se* no es la responsable de los cambios que se observan por efecto de la diabetes.

### **3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS.**

#### **3.4.1 CUANTIFICACIÓN DE LA INSULINA INMUNORREACTIVA EN EL PLASMA.**

La insulina inmunorreactiva presente en el plasma de las ratas controles, diabéticas y tratadas a los 15, 45 y 90 días de la inducción de la diabetes con STZ fue cuantificada por radioinmunoanálisis (Valverde y col., 1988) por el grupo de la Dra. Isabel Valverde (Dpto. de Metabolismo, Nutrición y Hormonas de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid). Las muestras de plasma (50  $\mu$ l) o de patrón de insulina de rata (0-20 ng/ml), en duplicado, se mezclan con  $^{125}$ I-insulina porcina (50 pg) y suero anti-insulina

(producido en cobaya en el mencionado laboratorio), a la dilución final de 1:100.000, en un volumen total de 1 ml. Los tubos se mantienen durante 3 días a 4°C, tiempo en el cual la reacción alcanza su equilibrio. Después de este periodo, se procede a la separación del complejo antígeno-anticuerpo del antígeno libre, mediante la absorción de este último por carbón activado (3%) saturado con dextrano (0.25%) previa adición a las muestras patrones de 50 µl de plasma humano. Las muestras fueron entonces centrifugadas a 2000 xg durante 10 minutos a 4°C, después de lo cual se descarta el sobrenadante, quedando en el tubo el sedimento de carbón con el péptido libre. La radiactividad absorbida se mide en un contador gamma, y se calcula, por diferencia con el total, el porcentaje de péptido unido al anticuerpo en cada muestra.

### **3.4.2. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO.**

#### **3.4.2.1 FIJACIÓN E INCUBACIÓN DE LAS SECCIONES PARA ESTUDIAR LA PRESENCIA DEL ANTÍGENO RELACIONADO CON EL FACTOR VIII DE COAGULACIÓN.**

Se realizan experimentos de inmunohistoquímica para determinar la presencia del antígeno relacionado con el Factor VIII de coagulación, un marcador de células del endotelio vascular, en secciones de ojo adyacentes a las utilizadas en microautorradiografía. También se analiza la presencia de dicho antígeno en el precipitado de las distintas centrifugaciones a las que son sometidas las membranas de retina durante su preparación (ver sección 3.2.4.4 de Materiales y Métodos).

Los cortes se descongelan lentamente, se fijan 10 minutos en acetona y se secan al aire 5 minutos antes de introducirlas en cloroformo 20 minutos. Después se secan 2-3 minutos y se incuban con una gota de una disolución de peróxido de hidrógeno para bloquear las peroxidasas endógenas.

A continuación, se lavan las preparaciones 3 veces con tampón fosfato 0.1 M pH 7.6 y se cubren con una gota del antisuero de conejo contra el antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación humano, diluido 1:200 en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.6, con BSA al 1%, a 25°C durante 30 minutos en una cámara húmeda.

### **3.4.2.2 FIJACIÓN E INCUBACIÓN DE LAS SECCIONES PARA ESTUDIAR LA PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA ET-1-IR.**

Se realizan experimentos de inmunohistoquímica para determinar la presencia y la distribución de ET-1-IR en secciones de ojo adyacentes a las utilizadas en microautorradiografía. Los cortes se descongelan lentamente y las secciones se fijan por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% durante 15 minutos a 25°C. El fijador se prepara por disolución del paraformaldehído en agua bidestilada a 50°C añadiendo NaOH 10 M, gota a gota, hasta su total disolución. Se deja enfriar y se tampona con fosfato (concentración final 100 mM, pH 7.4). A continuación se añade glutaraldehído al 25% en cantidad suficiente para conseguir una concentración final del 1%. Una vez fijadas las secciones, se lavan las preparaciones 3 veces con tampón fosfato 0.1 M pH 7.6 y se cubren con una gota del antisuero de conejo contra ET-1, diluido 1:400 en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.6, con BSA al 1%, a 25°C durante 40 minutos en una cámara húmeda.

### **3.4.2.3 REVELADO DE LAS SECCIONES.**

El proceso de revelado de las secciones es el mismo, tanto para las secciones incubadas con el antisuero de conejo contra el antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación humano como para el antisuero de conejo contra ET-1. Una vez terminado el período de incubación se lavan las secciones 3 veces con tampón fosfato 0.1 M pH 7.6, e inmediatamente a continuación, se revelan con el sistema de revelado "super sensitive immunodetection system" de BioGenex.

Este proceso se realiza en cámara húmeda, ya que es imprescindible que las preparaciones no se sequen en ningún momento durante el revelado. En primer lugar se escurren y se secan los portaobjetos alrededor del corte con un paño de algodón. A continuación, se añade un anticuerpo biotinilado de cabra contra inmunoglobulina de conejo, en cantidad suficiente para cubrir el corte, y se incuba 20 minutos a 25°C. Después se lavan las secciones 3 veces con tampón fosfato 0.1 M a pH 7.6 se escurren y se secan alrededor del corte. En un siguiente paso, se añade la enzima, una peroxidasa conjugada con estreptavidina, en cantidad suficiente para cubrir el corte y se incuba 20 minutos a 25°C. Se lava 3 veces con tampón fosfato 0.1 M a pH 7.6 y se escurren y se



secan los portaobjetos alrededor del corte. Se añade a continuación el sustrato o cromógeno, 3,3'-diaminobencidina (DAB), en cantidad suficiente para cubrir el corte y se incuba 20 minutos a 25°C. La reacción se para lavando 3 veces con agua desionizada. Se escurren y se secan las preparaciones histológicas, se tiñen con azul de toluidina (azul de toluidina al 0.05 % en tampón benzoato 10 mM) y se deshidratan con una serie de alcoholes y xileno. Por último, las preparaciones se montan con cubreobjetos para ser fotografiadas con un fotomicroscopio. En todos los casos se realizaron controles eliminando la incubación del tejido con el primer anticuerpo, y sustituyéndolo por suero normal de conejo. Estos controles en ningún caso presentaron inmunorreactividad positiva. Este tipo de experimentos se realiza por triplicado utilizando en cada experimento un ojo distinto de cada uno de los tres grupos de animales.

Para analizar los resultados de los experimentos de inmunohistoquímica usamos la aplicación informática Leica Qwin. En cada sección se escogen al azar y se capturan con una cámara digital conectada al microscopio tres campos del polo posterior del ojo. En cada uno se mide el área y la intensidad de la inmunotinción en cada una de las capas de la retina para comparar entre los tres grupos de ratas.

### **3.4.3. ENSAYOS DE UNIÓN DE LA ENDOTELINA A SUS RECEPTORES EN LAS MEMBRANAS DE RETINA.**

Los ensayos se realizaron basándose en el método descrito por Fernández-Durango y col. (1989). Para realizar este tipo de experimentos las preparaciones de membranas de retina se diluyen con tampón Tris 50 mM a pH 7.4 hasta conseguir una concentración de 6-8 µg de proteína/100 µl, y se reserva una cantidad suficiente para valorar la concentración de proteínas.

La unión de <sup>125</sup>I-ET-1 y <sup>125</sup>I-ET-3 a las membranas de retina se realiza tras un período de incubación de 120 minutos a 25°C en tampón Tris 50mM a pH 7.4 con PMSF 0.5 mM, bacitracina al 0.3%, aprotinina 0.8 mM y BSA al 0.1%, en un volumen final de 0.3 ml. Al terminar el período de incubación se detiene la reacción añadiendo 1 ml de tampón frío Tris-HCl 50 mM con un pH 7.4 a los tubos de incubación. A continuación, se filtra al vacío el contenido de los tubos sobre filtros Whatman GF/C que han sido previamente saturados durante al menos 60 minutos en una solución de polietilenimina al

0.03%. Cada tubo se lava tres veces con 3 ml. de tampón frío Tris 50 mM con un pH de 7.4 y después, cada filtro directamente, con otros 3 ml del mismo tampón. Los filtros se secan durante 5 minutos y su radiactividad se mide en un contador Gamma LKB con una eficiencia del 75%.

#### **3.4.3.1 ENSAYOS DE SATURACIÓN.**

Con este tipo de experimentos se pretende calcular la densidad de receptores (Bmax) en las membranas de retina y la afinidad, expresada como la constante de disociación (Kd), con la que las dos hormonas utilizadas se unen a sus receptores. Para ello, distintas concentraciones de  $^{125}\text{I-ET-1}$  y  $^{125}\text{I-ET-3}$  (entre 2.5 y 150 pM) se incuban con las membranas de retina. Para cada una de las concentraciones usadas se calcula la unión específica de cada hormona a sus receptores, substrayendo la unión no específica (cantidad de hormona marcada unida en presencia de ET-1 o ET-3 a una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$ ) de la unión total (cantidad de hormona marcada unida en ausencia de ET-1 o ET-3 no marcada).

Estos experimentos se realizaron por cuadruplicado con membranas de cada uno de los grupos de animales y para cada tiempo de tratamiento (15, 45, y 90 días). Dentro de cada experimento cada determinación se realizó por duplicado. Los resultados de este tipo de experimentos fueron analizados con los programas informáticos EBDA y LIGAND para obtener los valores de Kd y Bmax.

#### **3.4.3.2 ENSAYOS DE COMPETICIÓN PARA CALCULAR EL PORCENTAJE DE RECEPTORES TIPO A (ETA) Y TIPO B (ETB) DE ENDOTELINA.**

Con este tipo de experimentos se pretende calcular el porcentaje de receptores de endotelina presentes en las membranas de retina que son de tipo A (ETA) y de tipo B (ETB). Para ello se incuban las preparaciones de membranas de retina con  $^{125}\text{I-ET-1}$  a una concentración de 40 pM y la unión específica (la unión total menos la unión no específica, calculada como la unión en presencia de ET-1 0.1 $\mu\text{M}$ ) se normaliza como un 100 % de receptores de ET-1 (ETA + ETB). Simultáneamente se realizan estudios de unión de  $^{125}\text{I-ET-1}$  en presencia de Sarafotoxina 6c (S6c) a una concentración 0.1  $\mu\text{M}$ , para bloquear los receptores ETB, o en presencia de BQ123 a una concentración 1 $\mu\text{M}$ ,

para bloquear los receptores ETA. A partir de la unión específica en presencia de BQ123 se calcula el porcentaje de receptores A (la unión específica en ausencia de BQ123 menos la unión específica en presencia de este análogo expresada como porcentaje de la unión específica total ).

$$\% \text{ ETA} = \frac{(\text{Unión específica en ausencia de BQ123} - \text{Unión específica en presencia de BQ123})}{\text{Unión específica en ausencia de BQ123}} \times 100$$

A partir de la unión específica en presencia de S6c se calcula el porcentaje de receptores de tipo B (la unión específica en ausencia de S6c menos la unión específica en presencia de este análogo expresada como porcentaje de la unión específica total ).

$$\% \text{ ETB} = \frac{(\text{Unión específica en ausencia de S6c} - \text{Unión específica en presencia de S6C})}{\text{Unión específica en ausencia de S6c}} \times 100$$

El mismo tipo de experimentos se realiza utilizando  $^{125}\text{I-ET-3}$  a una concentración de 40 pM.

Estos experimentos se realizaron por cuadruplicado en membranas de cada uno de los grupos de animales y para cada tiempo de tratamiento. Dentro de cada experimento cada determinación se realizó por duplicado.

#### **3.4.4 EXPERIMENTOS DE UNIÓN COVALENTE DE AFINIDAD (CROSS-LINKING) DE $^{125}\text{I-ET-1}$ Y $^{125}\text{I-ET-3}$ A LAS MEMBRANAS DE RETINA.**

El método de unión covalente de afinidad se basa en el descrito para receptores de insulina por Massagué y col. (1985). Estos experimentos se realizan en las preparaciones de membranas de retina de los tres grupos de ratas a los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ. Se incuban las preparaciones de membranas de retina (45  $\mu\text{g}$  de proteínas/100 $\mu\text{l}$ ) con  $^{125}\text{I-ET-1}$  o  $^{125}\text{I-ET-3}$  a una concentración de 40 pM , en presencia o ausencia de ET-1 y ET-3 no marcadas, en un volumen total de 300  $\mu\text{l}$  de tampón Tris 50 mM pH 7.4, con PMSF

0.5 mM, aprotinina 0.8 mM, bacitracina al 0.3%, y BSA al 0.1%. Después de 120 minutos de incubación a 25°C, se centrifuga el medio de incubación durante 15 minutos a 30.000 xg a 4°C. El precipitado se resuspende en tampón HEPES 10 mM pH 7.4 con PMSF 0.5 mM, aprotinina 0.8 mM, bacitracina al 0.3%, y BSA al 0.1%. El proceso de centrifugación se repite otras dos veces en las mismas condiciones y al final, el precipitado con las membranas de retina, se resuspende en 300 µl de tampón HEPES 10 mM pH 7.4. Estos lavados de las membranas y el cambio de tampón son necesarios para eliminar todas las sustancias que pudieran dar una reacción indeseada con el disuccinimidil suberato (DSS) que se emplea a continuación. A la suspensión de membranas resultante de este proceso, se le añaden 2 µl de una disolución de DSS disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (2,8 mg/ml en DMSO) para conseguir una concentración final de 0.5 mM de DSS, y se incuba durante 15 minutos en agitación constante y a temperatura ambiente, para unir covalentemente las hormonas marcadas a sus receptores por la acción del DSS. La reacción se para por adición de 30 µl de acetato amónico 2 M para neutralizar el DSS no consumido en la reacción y, a continuación, se centrifuga a 30.000 xg durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se resuspende en el "tampón de muestra" (Tris-HCl 62.5 mM, sodio dodecil sulfato (SDS) al 2.05 %, sacarosa 0.58M, y azul de bromofenol al 0.02%), a una concentración de 0.5 mg de proteína/ml para realizar la electroforesis. Las muestras disueltas en el "tampón de muestra" se desnaturalizan sometiéndolas a ebullición durante 4 minutos.

### **3.4.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.**

La electroforesis se realiza siguiendo el método descrito por Laemmli y col. (1970). Para llevar a cabo la electroforesis se cargan 10 µl (aproximadamente 5µg de proteína) de cada muestra, solubilizada en SDS y desnaturalizada, en los pocillos del gel de poliacrilamida. En cada gel se reserva un pocillo para correr una mezcla de proteínas de peso molecular conocido, disueltas en el mismo tampón que la muestra, que son: miosina (200.000), β-galactosidasa de E.coli (116.250), fosforilasa b de músculo de conejo (97.400), albúmina de suero bovino (66.200), ovoalbúmina (45.000) y la anhidrasa carbónica bovina (31.000), cargándose 5 µg de proteína total por pocillo.

Una vez que los geles se dispusieron en la cubeta de electroforesis, ésta se llena con el "tampón de electroforesis" (Tris base 50 mM a pH 8,3, con glicina al 1,45%, y SDS al 1%) y

se aplica un voltaje constante de 125 V y un gradiente de corriente de 30 a 10 mA durante 1h y 45 min, tiempo que tarda en llegar el frente de azul de bromofenol al final del gel. Entonces los geles se separan de su soporte, se fijan y se tiñen simultáneamente, mediante inmersión en la "solución tinte" (etanol al 40%, a. acético al 10% y azul de Coomasie al 0,1%) durante 15 min. Se quita el exceso de tinte a los geles con agua destilada y se destiñen con "la solución destañadora" (etanol 10% y ácido acético al 7,5%) durante toda la noche. A continuación, se ponen en un baño con la "solución equilibrante" (etanol al 45% y glicerol al 5%) durante 30 minutos en agitación, para darles consistencia. Por último, los geles se colocan en un extendedor entre dos hojas de celofán humedecidas en la solución equilibrante hasta que están totalmente secos. Los geles así procesados se autorradiografían mediante la exposición de una película de rayos X en un chasis con placa amplificadora durante 7 días a -70°C. Las autorradiografías se digitalizan con un densitómetro LKB Image Master y se analizan con el programa informático Image Master para estimar el peso molecular de las bandas y su densidad óptica. Se realizan tres experimentos similares e independientes.

### **3.4.6. MICROAUTORRADIOGRAFÍA.**

Estos experimentos se basan en el método descrito por Rípodas y col. (1998) y se realizan con el objeto de localizar los receptores de endotelina en las distintas capas de la retina en los tres grupos de ratas a los 90 días tras la inducción de la diabetes. Se realizan tres experimentos independientes, utilizando en cada uno, un ojo diferente de cada grupo de ratas. Dentro de cada experimento todas las determinaciones se hacen por duplicado.

#### **3.4.6.1 INCUBACIÓN DE LAS SECCIONES DE LOS OJOS.**

Las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos ( $T^a$ , concentración iónica, tiempo de incubación y preincubación) se encontraron de una forma empírica, y están basados en estudios de unión de radioligandos, en los que se busca conseguir una unión específica adecuada, con un mínimo porcentaje de unión no específica (Herkenham y col., 1982; Kuhar, 1985; Millan y col., 1986)

Las secciones de los ojos obtenidas con el criostato se descongelan lentamente hasta 25°C. A continuación, se preincuban, a esta misma temperatura, en tampón Tris 50mM, pH

7.4, que contiene NaCl 100 mM, bacitracina al 0.3% y BSA al 1%, durante 15 minutos. Una vez concluida la preincubación, se secan rápidamente los portaobjetos alrededor del corte histológico y se colocan en posición horizontal en una cámara húmeda, evitando que la sección llegue a secarse. En un siguiente paso, se incuban los cortes histológicos durante 60 minutos a 25°C, cubriéndolos con una gota de tampón Tris 50mM a pH 7.4 con PMSF 0.5 mM, bacitracina al 0.3%, aprotinina 0.8 mM y BSA al 0.1%, que lleva en disolución la hormona marcada ( $^{125}\text{I-ET-1}$  o  $^{125}\text{I-ET-3}$ ) a una concentración de 40 pM y, en su caso, las hormonas no marcadas: ET-1 (0.1  $\mu\text{M}$ ), ET-3 (0.1  $\mu\text{M}$ ), S6c (0.1  $\mu\text{M}$ ) o BQ123 (1  $\mu\text{M}$ ), para determinar la unión no específica, o la presencia de los dos tipos de receptores de endotelina. Al concluir el periodo de incubación, se lavan los portaobjetos tres veces a 4°C durante 20 minutos con tampón Tris 50mM, pH 7.4, que contiene NaCl 100 mM, bacitracina al 0.3% y BSA al 1%. En último lugar, se sumergen durante 10 segundos en agua bidestilada a 4°C, antes de proceder a la fijación de los cortes histológicos.

#### **3.4.6.2 FIJACIÓN DE LAS SECCIONES.**

Las secciones se fijan por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% durante 1 hora a 4°C. Después, se lavan con tampón fosfato 100 mM, pH 7.4, y posteriormente con agua bidestilada, se dejan secar y se guardan en cajas, a 4°C, hasta su inmersión en emulsión fotográfica.

#### **3.4.6.3 INMERSIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS EN EMULSIÓN FOTOGRÁFICA.**

En una cámara oscura con luz de seguridad (una lámpara de 15 w bajo un filtro Kodak nº1), la emulsión fotográfica LM1 se diluye con glicerol al 1% en una proporción 1:1, se calienta a 43°C y se mantiene a esa temperatura en un baño. Entonces, los portaobjetos precalentados a 43°C en una placa caliente, se sumergen verticalmente durante 5 segundos en la emulsión. A continuación, se sacan los portaobjetos de la emulsión y se dejan escurrir en posición vertical sobre material absorbente durante 2-3 minutos, para luego colocarlos sobre una placa fría a 4°C hasta que se secan totalmente. Por último, los portaobjetos se guardan durante 6-8 días a 4°C en cajas opacas, que contienen gel de sílice como desecante, para su exposición. Una vez concluido el periodo de exposición de la emulsión fotográfica, los

portaobjetos se revelan en oscuridad con líquido revelador Kodak D-19 durante 5 minutos a 20°C, se fijan con el fijador Hypam diluido 1:4 durante 15 minutos y se lavan con agua corriente durante 20 minutos. El tiempo de exposición se determina en cada experimento reservando secciones que son reveladas tras diferentes periodos de tiempo, para conseguir una densidad de granos de plata adecuada.

#### **3.4.6.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA MICROAUTORADIOGRAFÍA**

Las secciones se observan con un microscopio con condensador de campo oscuro y se fotografía, con película de 36 mm en blanco y negro (100 ASA), la zona adyacente al nervio óptico en cada una de las retinas. Las condiciones de iluminación (posición del condensador e intensidad luminosa) fueron las mismas para todas las secciones. A continuación, se tiñen las secciones con azul de toluidina (azul de toluidina al 0.05 % en tampón benzoato 10 mM), se deshidratan, pasándolos por una serie de alcoholes y xileno, y se montan los portaobjetos con cubreobjetos. Una vez teñidos los cortes, se fotografían con el condensador de campo claro los mismos campos que habían sido fotografiados en campo oscuro, para su posterior comparación.

Los negativos de las fotografías tomadas con el condensador de campo oscuro se digitalizan y analizan para determinar la densidad óptica debida a los granos de plata en las distintas capas de la retina. Para ello, se mide la densidad óptica sobre una línea que atraviesa perpendicularmente a la retina, en una zona representativa de cada una de las secciones, con el programa informático de densitometría Image Master. Este tipo de análisis se realiza en todos los cortes de los tres experimentos realizados por separado, para poder comparar los resultados.

#### **3.4.7. CUANTIFICACIÓN DE LA ET-1-IR EN EL PLASMA.**

##### **3.4.7.1 EXTRACCIÓN DE LA ET-1 INMUNORREACTIVA.**

Los péptidos fueron extraídos según el método usado para el PAN plasmático (Gutkoswka y col., 1987). Se utiliza un volumen de 1.5 ml de plasma de cada una de las ratas de cada grupo y de cada tiempo de tratamiento. Se extrae la ET-1 utilizando columnas Sep-Pak C-18 que fueron previamente activadas con 8 ml de acetonitrilo puro y a continuación con 8 ml de acetato amónico al 2% a pH 4.0. El plasma se aplica en las

columnas que se lavan con 5 ml de acetato amónico al 2% a pH 4.0, la ET-1 absorbida en la columna se eluye con 3 ml de acetonitrilo al 60 % en acetato amónico al 0.2% a pH 4.0. El disolvente orgánico se evapora bajo una corriente de gas nitrógeno y a continuación los eluidos se liofilizan y se guardan a -20°C.

### 3.4.7.2 RADIOINMUNOANÁLISIS DE ET-1.

Este método está basado en la técnica de radioinmunoanálisis descrito por Gutkowska y col. (1987). El residuo liofilizado se resuspende con el tampón de radioinmunoanálisis (RIA) (tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 con NaCl al 0.3%, BSA al 0.1% y Tritón-X-100 al 0.1%). La ET-1-IR se cuantifica usando antisuero de conejo anti-ET-1 con una dilución final de 1:90.000. Se usa  $^{125}\text{I}$ -ET-1 como marcador y como hormona patrón se utiliza ET-1 comercial. El antisuero reacciona con un 100% de la ET-1, y tiene una reacción cruzada del 7% con la ET-2, del 7% con la ET-3, del 35% con la "Big-ET-1" porcina, del 17% con la "Big-ET-1" humana y no presenta reacción cruzada con otros péptidos no relacionados como la somatostatina,  $\beta$ -endorfina, angiotensina, vasopresina, o PAN.

El radioinmunoanálisis se comienza incubando 100  $\mu\text{l}$  de las muestras o de la ET-1 estándar con 100  $\mu\text{l}$  del antisuero durante 48 horas a 4°C. A continuación, se añade  $^{125}\text{I}$ -ET-1 a una concentración final de 6 pM y se incuba durante otras 24 horas a 4°C. El complejo hormona marcada-anticuerpo se separa de la hormona marcada libre con la adición de 100  $\mu\text{l}$  de un antisuero de cabra anti-gammaglobulina de conejo diluido 1:20 más 100  $\mu\text{l}$  de suero normal de conejo diluido 1:50. Después de 2 horas de incubación a 25°C, se añade 1 ml de polietilenglicol 8.000 diluido al 6.25% en agua bidestilada y se centrifuga los tubos a 900 xg durante 20 minutos. El sobrenadante se elimina por aspiración, y la radiactividad del precipitado se mide en un contador gamma LKB. La sensibilidad del RIA es de 0.12 fmol/tubo. El 50% de intercepción es de 2.7 fmol/tubo. La variación interensayo es del 15%, y la intraensayo del 12%. La recuperación de 1.5 y 3 fmol de ET-1 añadidos al plasma durante la extracción en las columnas es del  $78 \pm 4.2\%$  (n=10).



### 3.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS.

El cálculo de la  $K_d$  y la  $B_{max}$  a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de saturación, fueron hallados mediante un análisis de regresión no lineal utilizando los programas EBDA y LIGAND. El estudio estadístico se realiza con un ordenador personal mediante el programa informático SPSS para Windows, versión 6.0. En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de los datos, calculando algunos parámetros estadísticos resumen de los mismos (valor máximo, valor mínimo, media, desviación típica, error estándar etc.). Para la comparación de medias se utiliza, tras la aplicación del test de Levene para la igualdad de varianzas, un análisis de varianza de una vía seguido del test de Bonferroni.

## **4. RESULTADOS**

## 4.1. PARÁMETROS METABÓLICOS Y BIOQUÍMICOS.

### 4.1.1 PESO CORPORAL.

Las curvas que representan la evolución del peso corporal en los tres grupos de ratas se muestran en la Fig.9. En el grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina (GT), el peso corporal aumenta con la edad de forma paralela a como lo hace en el grupo control (GC), aunque a partir de la sexta semana, contada desde el comienzo del experimento, las ratas del GT tienen un peso ligeramente inferior a las del GC. Sin embargo, los animales del grupo de ratas diabéticas (GD) no aumentan su peso significativamente durante todo el periodo de tiempo que abarca el experimento.

### EVOLUCIÓN DEL PESO

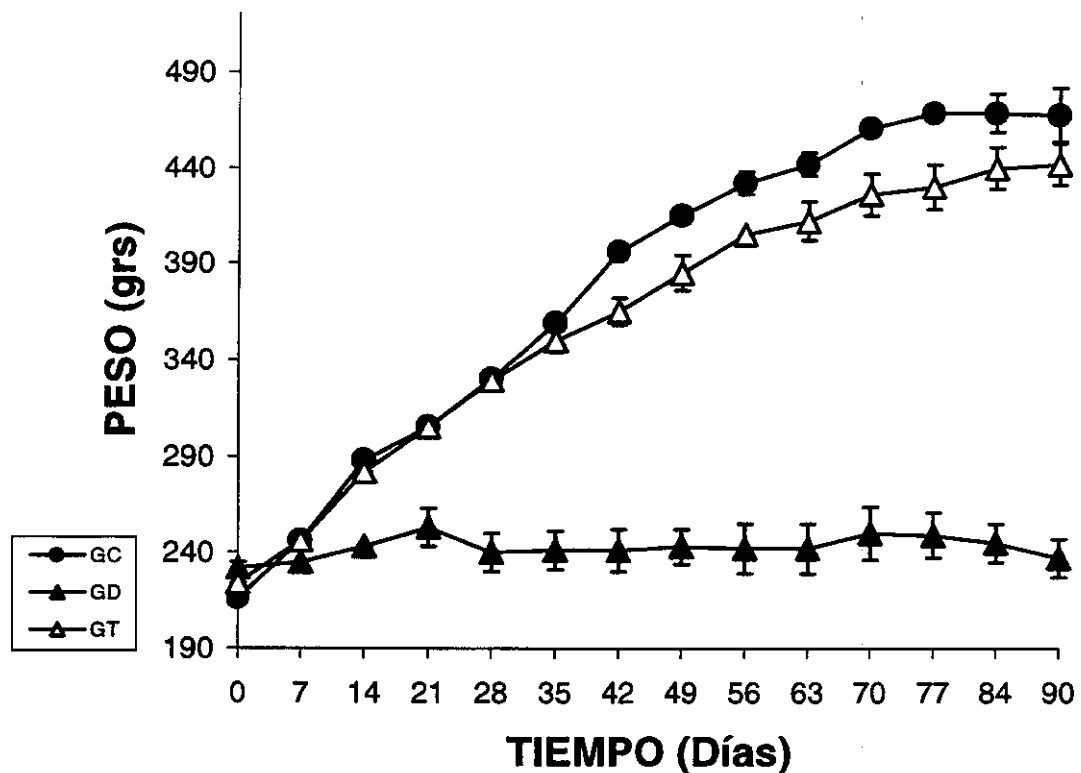


Fig. 9.- Evolución del peso durante el experimento, en los animales del GC (●), del GD (▲) y del GT (△). Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM del peso de todos los individuos de cada grupo.

### 4.1.2 GLUCEMIA.

En la Fig. 10 se muestran los valores medios de la glucemia en los tres grupos de ratas durante el tiempo que abarca el experimento. La glucemia de las ratas del GD se encuentra elevada significativamente, en relación con los valores del GC, desde las 48 horas del tratamiento con STZ, y se mantiene alta durante todo el experimento. En las ratas del GT debido al tratamiento con insulina, la glucemia se mantiene en valores próximos a la de los animales del GC, aunque se observan ligeras fluctuaciones de la glucemia, especialmente durante los 15 primeros días de tratamiento, que se producen hasta que se ajusta la dosis de insulina adecuada a cada animal.

### EVOLUCIÓN DE LA GLUCEMIA

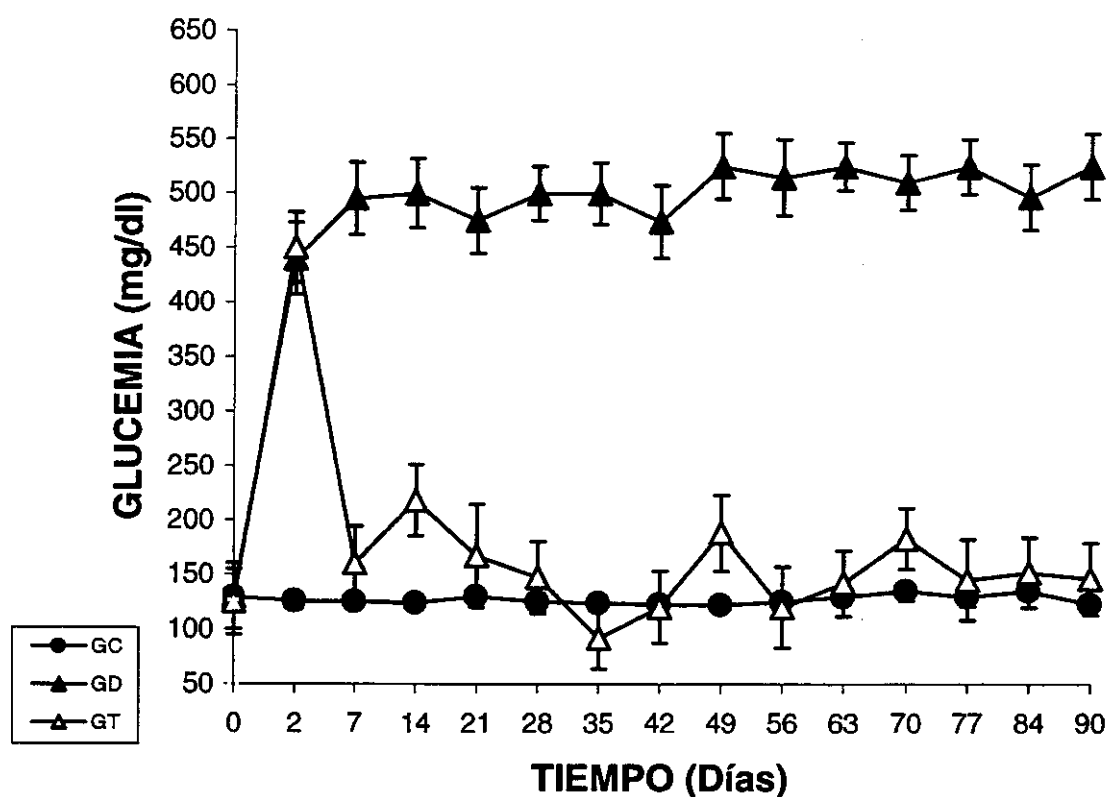


Fig 10.- Evolución de la glucemia durante el experimento en los animales del GC (●), del GD (▲) y del GT (△). Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de la glucemia de todos los individuos de cada grupo.

### 4.1.3 INSULINA INMUNORREACTIVA.

El tratamiento con STZ provoca en las ratas la incapacidad de producir insulina en el páncreas, debido a la destrucción de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans, como demuestra la baja concentración de insulina-IR en el plasma de las ratas del GD (Fig. 11), que es significativamente distinta a la presente en el GC a los tres tiempos estudiados ( $P < 0.01$ ). Debido a la inyección diaria de insulina, en el GT la concentración de insulina-IR es similar a la del GC, sin que exista entre ambos grupos una diferencia significativa en ninguno de los tres tiempos estudiados.

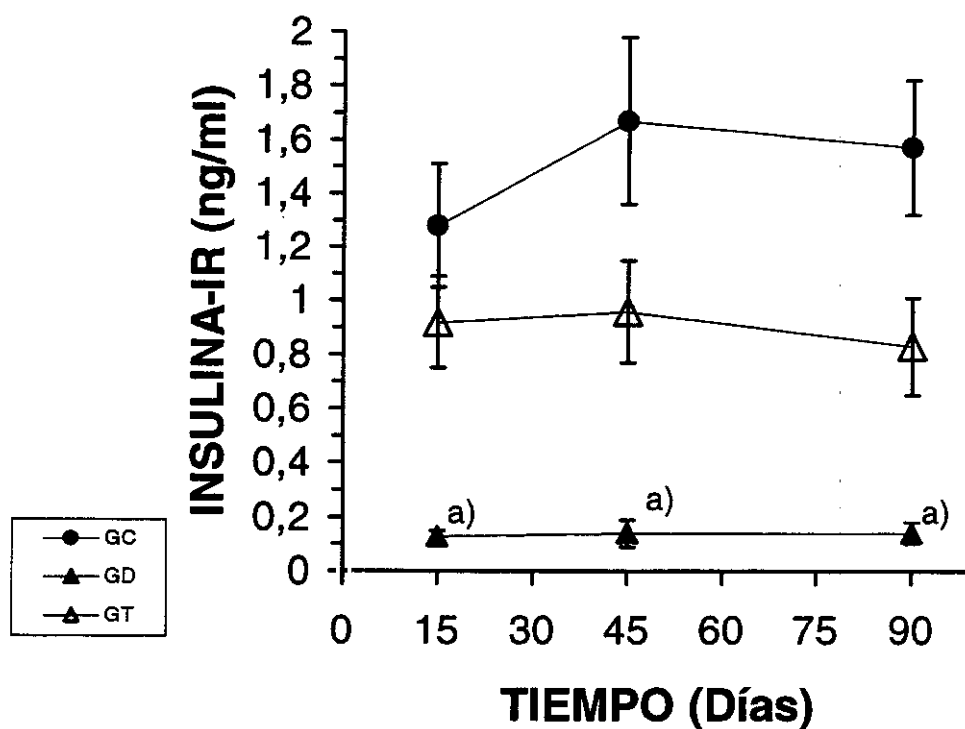


Fig. 11.- Insulina inmunorreactiva en el plasma de los animales del GC (●), del GD (▲) y del GT (△) a los 15, 45 y 90 días de la inducción de la diabetes. a) diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) respecto del GC, b) diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) respecto del GT.

## **4.2. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS SECCIONES DE OJO Y DEL PRECIPITADO DE MEMBRANAS.**

### **4.2.1. ANÁLISIS DE LAS SECCIONES DE OJO.**

#### **4.2.1.1 DISTRIBUCIÓN DE LA ET-1-IR.**

En la Fig. 12 se muestran los resultados de la incubación de las secciones de ojos, procedentes de los tres grupos de ratas a los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ, con el antisuero de conejo contra ET-1. En las secciones correspondientes al GC (Fig. 12 A), las capas en que se detecta una mayor inmunorreactividad son la capa de células ganglionares (CCG) y la capa de núcleos interna (CNI) de la retina y la coroides. En comparación con el GC, en el GD (Fig. 12 B) la señal es más intensa en las tres capas mencionadas, y además es abundante la inmunotinción en la capa de conos y bastones (CCB), capa en la que apenas se observa señal en el GC. En el GT (Fig. 12 C) la distribución e intensidad de la señal de la ET-1-IR es similar a la del GC, a excepción de lo que ocurre en la CCB, en la que la inmunorreactividad es claramente más intensa que en el GC.

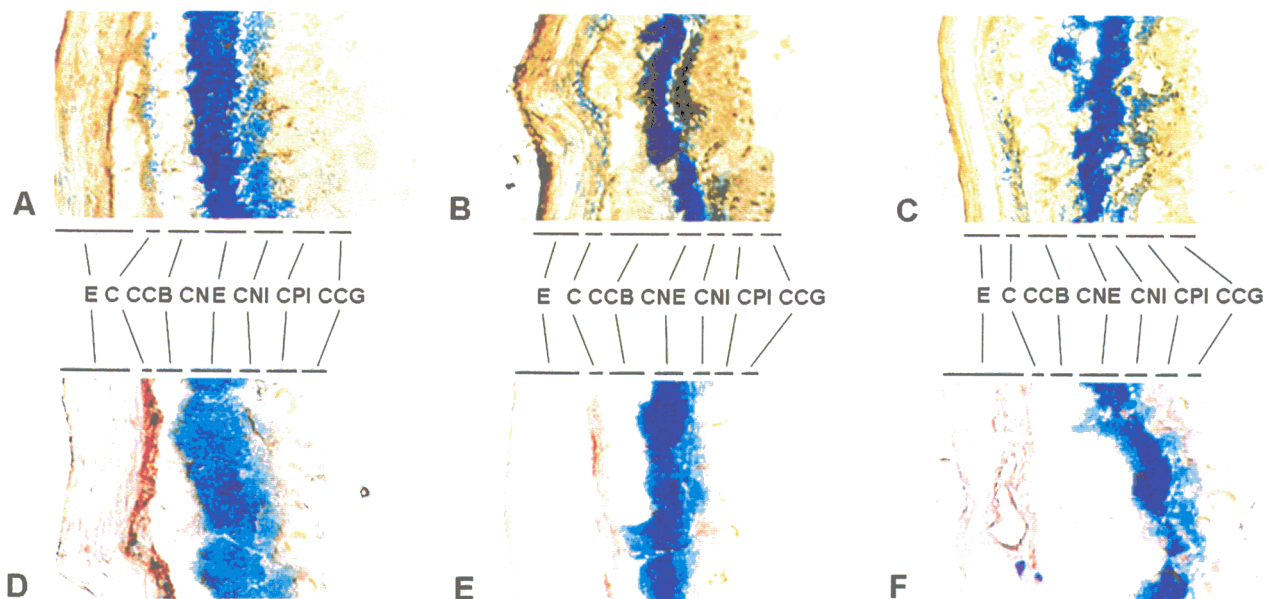
#### **4.2.1.2 DISTRIBUCIÓN DEL ANTÍGENO RELACIONADO CON EL FACTOR VIII DE COAGULACIÓN.**

En la Fig. 12 se muestran los resultados de la incubación de las secciones de ojos procedentes de los tres grupos de ratas, a los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ, con el antisuero de conejo contra el antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación humano. Puede observarse la existencia de inmunorreactividad en la CCG, entre las dos capas de núcleos de la retina (CNE y CNI) y en la coroides, en las secciones de los tres grupos de animales. No se aprecian diferencias significativas en la intensidad y la distribución de la señal entre los tres grupos de animales.

Cuando las secciones se incubaron con suero normal de conejo, en vez de en presencia del antisuero de conejo, las secciones quedaron libres de la inmunotinción.

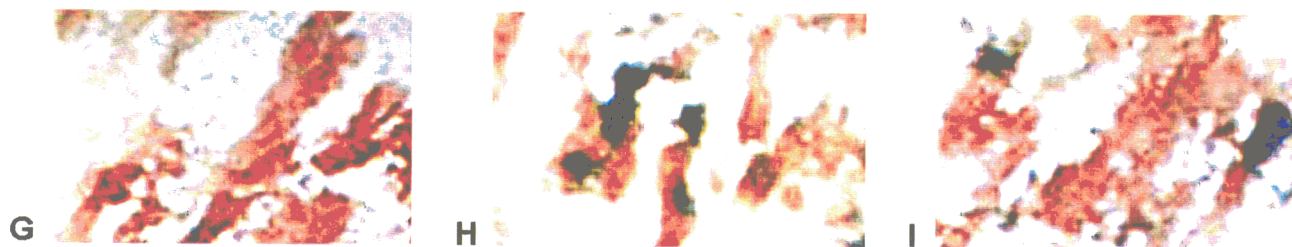
**Fig. 12.-** Localización inmunohistoquímica de la ET-1-IR (A-C) y del factor-VIII-IR (D-L) en las secciones de ojo (A-F) y en el primer (G-I) y segundo (J-L) precipitado de la preparación de membranas procedentes de ratas del GC (A,D,G,J), del GD (B,E,H,K), y del GT (C,F,I,L) a los 90 días de la inducción de la diabetes. Las secciones fueron incubadas con el antisuero de conejo contra el antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación humano o con el antisuero de conejo contra ET-1, reveladas con inmunoperoxidasa y DAB, y teñidas con azul de toluidina. (E esclerótica, C coroides, CCB capa de conos y bastones, CNE capa de núcleos externa, CNI capa de núcleos interna, CPI capa plexiforme interna, CCG capa de células ganglionares.(80X).

ET-1-IR

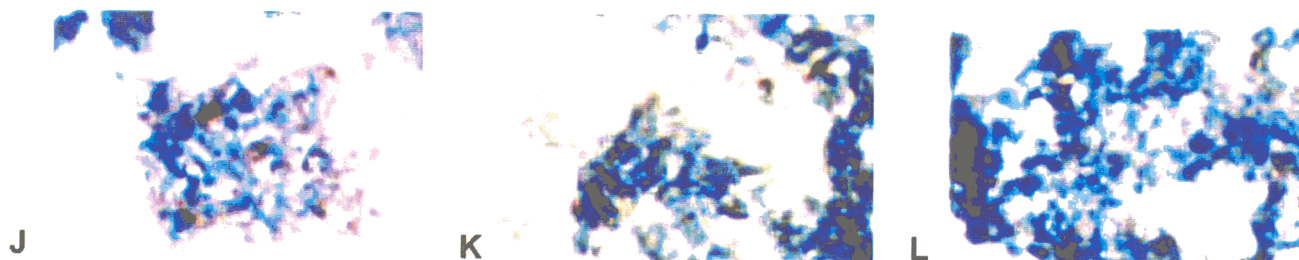


FACTOR-VIII-IR

PRIMER PRECIPITADO



SEGUNDO PRECIPITADO





#### **4.2.2 ANÁLISIS DE LAS SECCIONES DE LOS PRECIPITADOS DE LAS PREPARACIONES DE MEMBRANAS DE RETINA.**

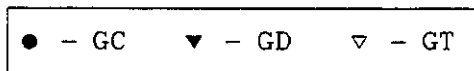
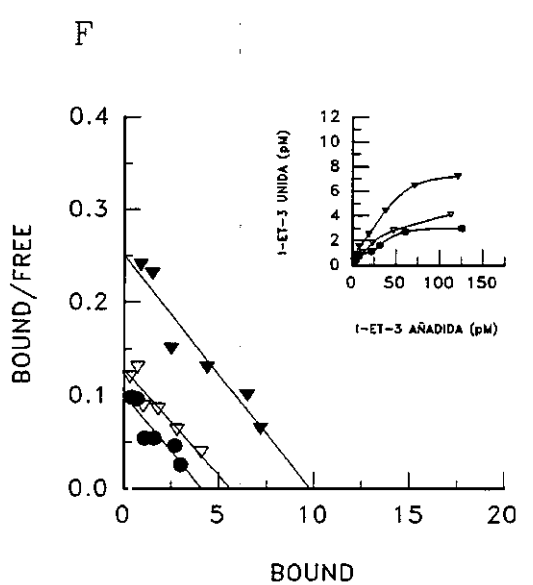
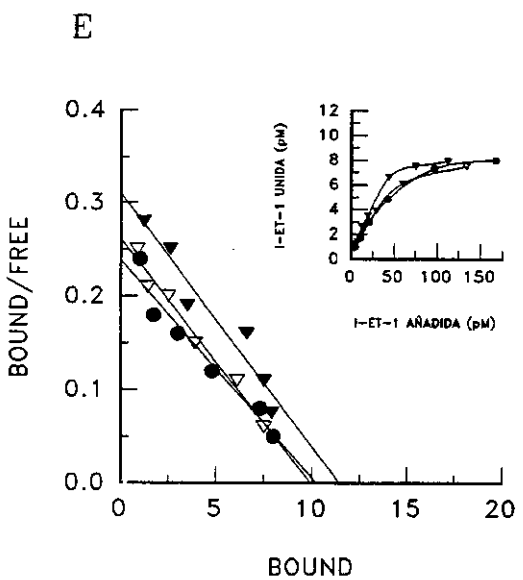
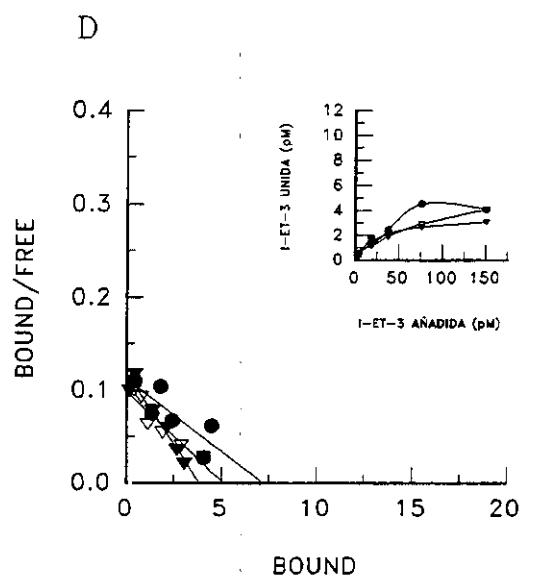
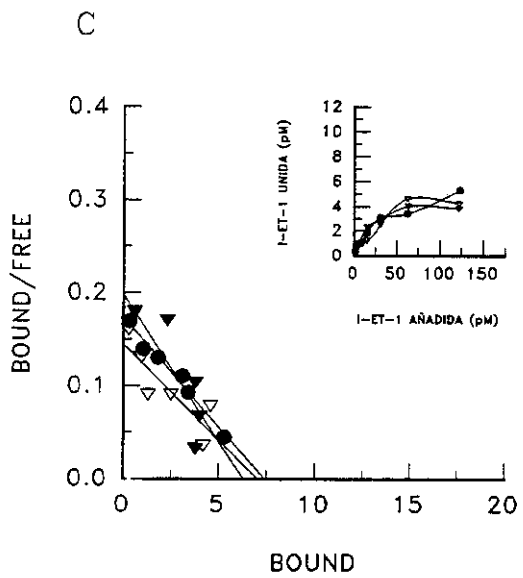
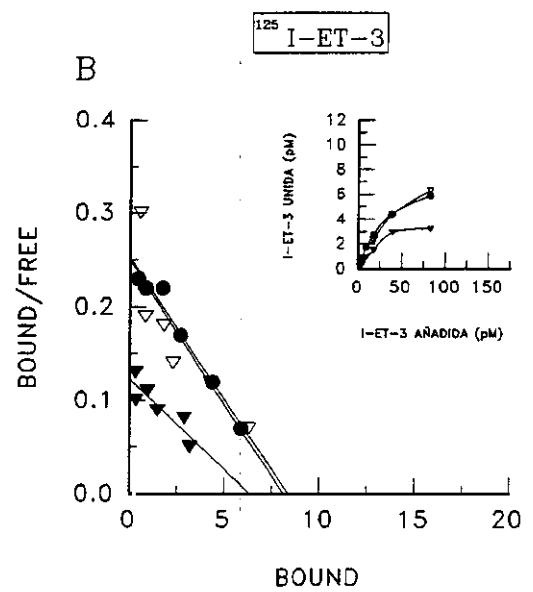
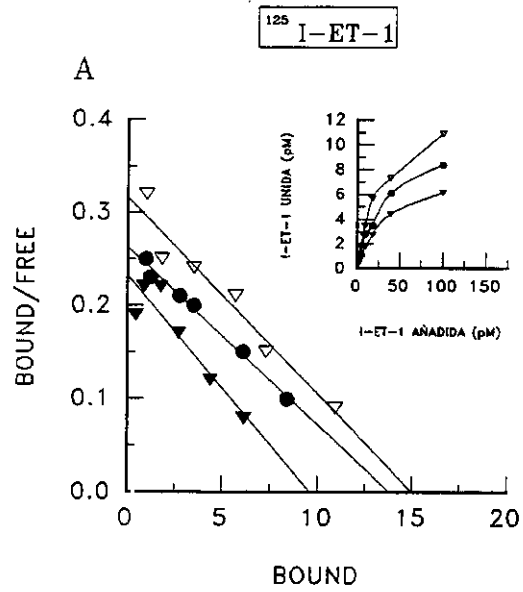
El análisis inmunohistoquímico de los precipitados obtenidos durante la preparación de membranas (Fig. 12) muestra que el precipitado obtenido en la primera centrifugación de la preparación de las membranas de retinas (primer precipitado), presenta una elevada inmunorreactividad frente al antisuero contra el factor VIII de coagulación humano, mientras que el precipitado obtenido con la segunda centrifugación de la suspensión de membranas de retina (segundo precipitado), apenas es inmunorreactivo. Estos resultados indican que la primera centrifugación a que es sometido el homogeneizado de las retinas, elimina la mayor parte de los vasos de la suspensión de membranas en los tres grupos de ratas.

#### **4.3. ENSAYOS DE UNIÓN DE LA ENDOTELINA A SUS RECEPTORES EN LAS MEMBRANAS DE RETINA.**

En los tres grupos de ratas y para los tres tiempos estudiados, la unión de  $^{125}\text{I-ET-1}$  y  $^{125}\text{I-ET-3}$  a las membranas de retina aumenta proporcionalmente con el incremento de la concentración de proteínas en el medio de incubación, en el rango de 5 a 50  $\mu\text{g}$  de proteína. Esta unión es específica, ya que es desplazada por ET-1 o ET-3 (0.1  $\mu\text{M}$ ), y sin embargo otros péptidos como somatostatina, PAN, o insulina no afectan a dicha unión. La unión no específica en estos ensayos, la que no es desplazable por ET-1 o ET-3, fue en todos los casos inferior al 10% de la unión total.

##### **4.3.1 ENSAYOS DE SATURACIÓN.**

Estos ensayos se realizan para calcular la afinidad y la densidad de los sitios de unión para la  $^{125}\text{I-ET-1}$  y  $^{125}\text{I-ET-3}$  en las membranas de la retina neural de los tres grupos de ratas, a los tres tiempos estudiados.



En estudios previos (de Juan y col., 1993 y 1995) hemos demostrado que, en la retina neural de ratas normales, están presentes dos tipos de receptores para las ETs, el receptor ETA, con mayor afinidad por la ET-1 que por ET-3 y el receptor ETB, con igual afinidad por ET-1 y ET-3. Así mismo, hemos podido comprobar que, debido a la concentración de hormona marcada que se usa en estos experimentos (hasta un máximo de 150 pM), la unión de  $^{125}\text{I-ET-3}$  a los receptores ETA es prácticamente despreciable, por causa de la baja afinidad que esta hormona tiene por los receptores ETA (la  $K_d$  de la ET-3 por el receptor ETA está entre 10 y 100 nM). Por tanto los receptores que se ponen de manifiesto en los ensayos de saturación usando  $^{125}\text{I-ET-3}$  son receptores, en su práctica totalidad, ETB, mientras que los detectados usando  $^{125}\text{I-ET-1}$  corresponden a la suma de los receptores ETA y ETB.

Al aplicar la transformación de Scatchard (Scatchard, 1949) a los resultados de los ensayos de saturación utilizando  $^{125}\text{I-ET-1}$  y  $^{125}\text{I-ET-3}$ , obtenemos las rectas cuya pendiente representa la constante de disociación ( $K_d$ ), y cuyo punto de corte con el eje de las abcisas representa la densidad de receptores ( $B_{\text{max}}$ ). Ambos parámetros se obtienen en unidades pM, y en el caso de la  $B_{\text{max}}$  las unidades son transformadas a fmol/mg de proteína para poder comparar los valores entre distintos ensayos.

La Fig. 13 muestra las curvas de saturación (gráficas pequeñas) y las correspondientes transformaciones de Scatchard (gráficas grandes) utilizando  $^{125}\text{I-ET-1}$  (columna izquierda) y  $^{125}\text{I-ET-3}$  (columna derecha) en un experimento representativo con membranas de retina de cada uno de los grupos de ratas a los 15 (A y B), 45 (C y D) y 90 (E y F) días de la inducción de la diabetes.

El análisis de los resultados, utilizando los programas informáticos EBDA y LIGAND, de cuatro experimentos independientes y similares al anterior indicaron la presencia de una sola clase de sitios de unión para ambas hormonas marcadas, puesto que el coeficiente de Hill, que representa el ajuste de los puntos a una línea recta no fue significativamente distinto de 1 en ningún caso. El análisis estadístico (comparación de medias mediante un análisis de varianza de una vía seguido del test de Bonferroni) de los resultados de los experimentos de saturación (Tabla I), demuestra que los valores de  $K_d$  de la  $^{125}\text{I-ET-1}$  no son significativamente diferentes, tanto entre los tres grupos de ratas para cada tiempo estudiado, como dentro de cada grupo en cada uno de tres tiempos estudiados, lo que indica que en todos los grupos de animales, la afinidad de la  $^{125}\text{I-ET-1}$  por sus sitios de unión, es la misma. De igual manera, tampoco existen diferencias significativas entre los valores de  $K_d$  para la  $^{125}\text{I-ET-3}$ , ni entre grupos, ni dentro de cada grupo, a los tres tiempos estudiados.

TABLA I. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE SATURACIÓN.

GRUPO EXPERIMENTAL	<sup>125</sup> I-ET-1		<sup>125</sup> I-ET-3	
	Kd	Bmax	Kd	Bmax
15 DÍAS DE TRATAMIENTO				
GRUPO CONTROL (GC)	61±12	198±15	57±10	106±5.7
GRUPO DIABÉTICO (GD)	47±13	119±24 <sup>a)</sup>	52±8	83±5.6 <sup>a) b)</sup>
GRUPO TRATADO (GT)	65±16	175±15	66±8	110±7.8
45 DÍAS DE TRATAMIENTO				
GRUPO CONTROL (GC)	61±8	150±35	44±6	98±13
GRUPO DIABÉTICO (GD)	49±6	143±21	46±9	120±15 <sup>c)</sup>
GRUPO TRATADO (GT)	48±5	164±26	56±6	113±16
90 DÍAS DE TRATAMIENTO				
GRUPO CONTROL (GC)	63±3	131±15 <sup>c)</sup>	41±3	54±7 <sup>c) d)</sup>
GRUPO DIABÉTICO (GD)	51±4	141±25	40±4	110±20 <sup>a) b)</sup>
GRUPO TRATADO (GT)	57±3	171±21	52±6	66±9 <sup>c) d)</sup>

**Tabla I.-** Valores de Kd (pM) y Bmax (fmol/mg de proteína) obtenidos a partir de cuatro experimentos de saturación independientes utilizando <sup>125</sup>I-ET-1 y <sup>125</sup>I-ET-3 y membranas de retina de los tres grupos de ratas a los 15, 45 y 90 días de la inducción de la diabetes. Los datos son la media ± SEM (n=4), <sup>a)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto del GC para un mismo tiempo, <sup>b)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto del GT para un mismo tiempo, <sup>c)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto de los 15 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales, <sup>d)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto de los 45 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales.

Por el contrario, existen diferencias significativas en la Bmax de la <sup>125</sup>I-ET-1 y la <sup>125</sup>I-ET-3 entre los distintos grupos de animales, por lo que, para una mejor observación y estudio se han representado gráficamente estos valores (de la Tabla I) en relación con el tiempo de tratamiento de las ratas (Fig. 14).

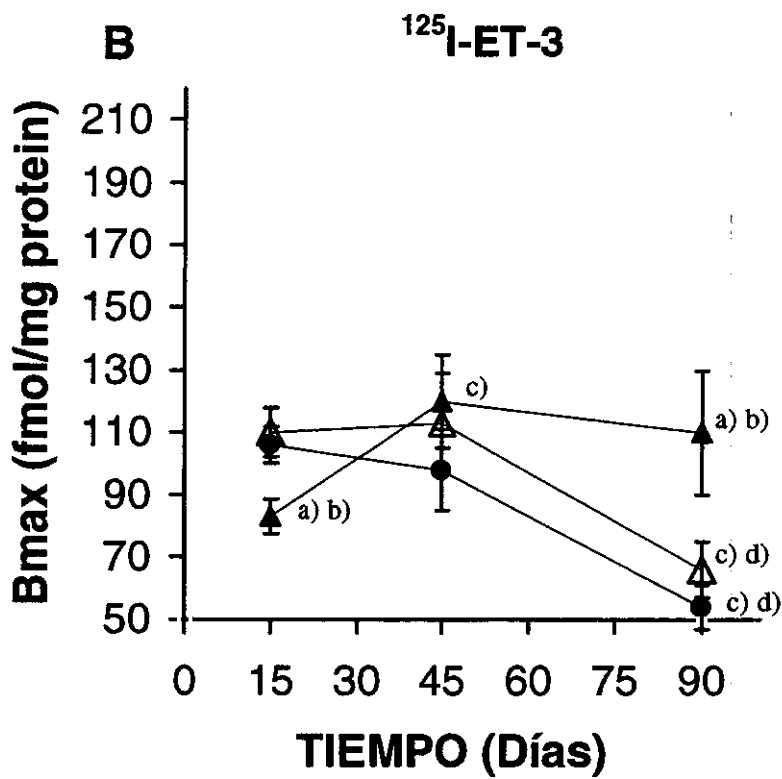
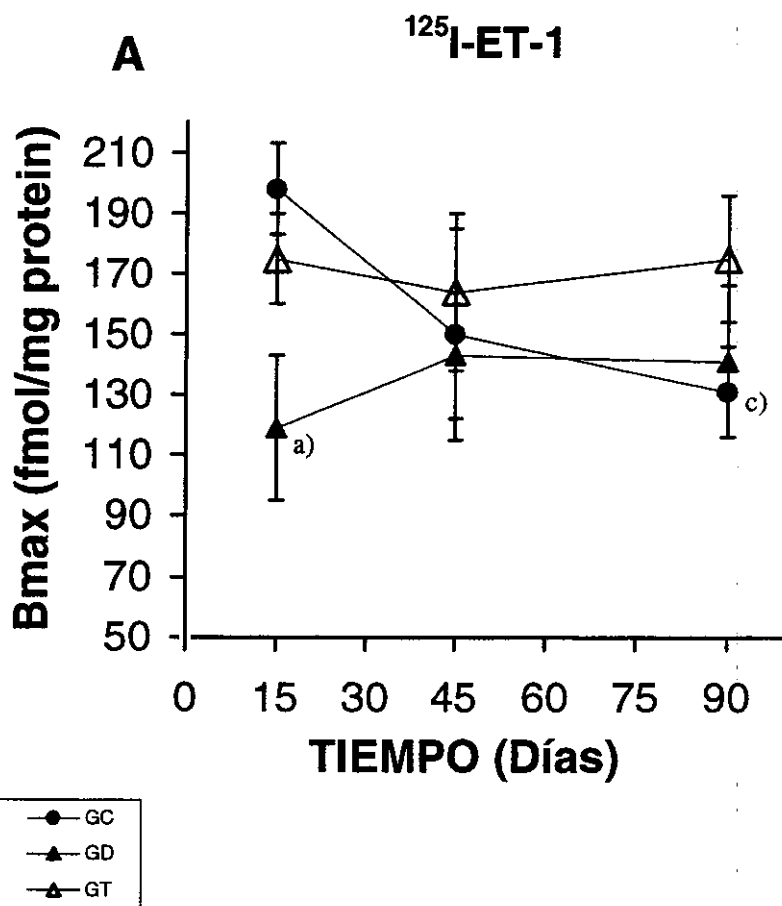
En la Fig. 14A puede observarse que, al comparar entre los tres grupos de ratas para un mismo tiempo, se observa que la Bmax para <sup>125</sup>I-ET-1:

- 1) a los 15 días, en el GD, es significativamente menor que en el GC.
- 2) a los 45 y 90 días no existen diferencias significativas entre los tres grupos de animales.

En la misma Fig. 14A, en relación con el tiempo, el valor de Bmax para <sup>125</sup>I-ET-1:

- 1) en el GC disminuye con la edad, siendo significativamente mayor en las ratas de 15 días que en las de 90 días.
- 2) en el GD tiende a aumentar con la duración de la diabetes, aunque no existen diferencias significativas entre los tres tiempos estudiados.
- 3) en el GT no hay variaciones entre los tres tiempos estudiados.

**Fig. 14.-** Representación gráfica de los valores de Bmax (fmol/mg de proteína) obtenidos a partir de los resultados de los experimentos de saturación (Tabla I) utilizando <sup>125</sup>I-ET-1 (gráfica A) y <sup>125</sup>I-ET-3 (gráfica B) con membranas de retina de los animales del GC (●), del GD (▲) y del GT (△) a los 15, 45 y 90 días de la inducción de la diabetes. Las barras verticales representan la SEM de cada determinación. <sup>a)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto del GC para un mismo tiempo, <sup>b)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto del GT para un mismo tiempo, <sup>c)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto de los 15 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales, <sup>d)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto de los 45 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales (n=4).



En la misma Fig. 14B, en relación con el tiempo, el valor de Bmax para <sup>125</sup>I-ET-3:

- 1) en el GC y el GT disminuye con el tiempo, siendo significativamente mayor a los 15 y a los 45 días que a los 90 días en ambos grupos.
- 2) en el GD aumenta con el tiempo, y es significativamente menor a los 15 días que a los 45 días.

#### 4.3.2 ENSAYOS DE COMPETICIÓN PARA CALCULAR EL PORCENTAJE DE RECEPTORES TIPO A (ETA) Y TIPO B (ETB) DE ENDOTELINA.

Los resultados obtenidos en estos experimentos aparecen reflejados en la Tabla II, en la que se muestran los porcentajes de receptores ETA y ETB calculados usando los análogos específicos BQ123 (antagonista del receptor ETA) y S6c (agonista del receptor ETB) en los tres grupos de ratas para los tres tiempos estudiados.

TABLA II. RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE DESPLAZAMIENTO UTILIZANDO LOS ANÁLOGOS S6C Y BQ123.

GRUPO EXPERIMENTAL	USANDO BQ123		USANDO S6C	
	% ETA	% ETB	%ETA	%ETB
15 DÍAS DE TRATAMIENTO				
RATAS CONTROLES (GC)	36±10	64±10	39±7	61±7
RATAS DIABÉTICAS (GD)	41±11	59±11	57±9	43±9
RATAS TRATADAS (GT)	31±15	69±15	36±6	64±6
45 DÍAS DE TRATAMIENTO				
RATAS CONTROLES (GC)	53±9	47±9	34±7	66±7
RATAS DIABÉTICAS (GD)	36±3	64±3	36±3	64±3
RATAS TRATADAS (GT)	36±4	64±4	39±5	61±5
90 DÍAS DE TRATAMIENTO				
RATAS CONTROLES (GC)	49±4	51±4	51±3	49±3
RATAS DIABÉTICAS (GD)	25±2 <sup>a) b) c)</sup>	75±2 <sup>a) b) c)</sup>	31±3 <sup>a) c)</sup>	69±3 <sup>a) c)</sup>
RATAS TRATADAS (GT)	37±4	63±4	53±6	47±6

Tabla II.- Porcentaje de receptores tipo A (ETA) y tipo B (ETB) obtenidos a partir de cuatro experimentos de competición realizados de forma independiente utilizando <sup>125</sup>I-ET-1 y membranas de retina de los tres grupos de ratas a los 15, 45 y 90 días de la inducción de la diabetes, en presencia de los análogos específicos BQ123 y S6c. Los datos son la media ± SEM (n=4). <sup>a)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto del GC para un mismo tiempo, <sup>b)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto del GT para un mismo tiempo, <sup>c)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto de los 15 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales, <sup>d)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto de los 45 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales.

Puede observarse que, en cada grupo de animales, el porcentaje de receptores calculado a partir de los experimentos realizados con uno de los análogos, es similar al calculado utilizando el otro análogo. Por otra parte, cuando se suma el porcentaje de receptores ETA calculado utilizando uno de los análogos y el porcentaje de receptores ETB calculado utilizando el otro análogo, el resultado no es, en ningún caso, significativamente distinto de 100.

En la Fig. 15, utilizando los valores de la Tabla II, se representa gráficamente la proporción de receptores ETA y ETB calculada usando los análogos BQ123 y S6c, respectivamente. En la Fig. 15A puede observarse que, al comparar entre los diferentes grupos para un mismo tiempo, se observa que la proporción de receptores ETA:

- 1) a los 15 y a los 45 días no existen diferencias significativas entre los tres grupos de animales.
- 2) a los 90 días es significativamente menor en el GD que en el GC.

En la misma Fig. 15A, en relación con el tiempo de tratamiento, la proporción de receptores ETA:

- 1) en el GC tiende a aumentar, aunque no existen diferencias significativas.
- 2) en el GD disminuye, y es significativamente mayor a los 15 que a los 90 días.
- 3) en el GT tiende a aumentar, aunque no existen diferencias significativas.

En la Fig. 15B puede observarse que, al comparar entre los diferentes grupos para un mismo tiempo, se observa que la proporción de receptores ETB:

- 1) a los 15 y a los 45 días no aparecen diferencias significativas entre los tres grupos.
- 2) a los 90 días, en el GD, es significativamente mayor que en el GC.

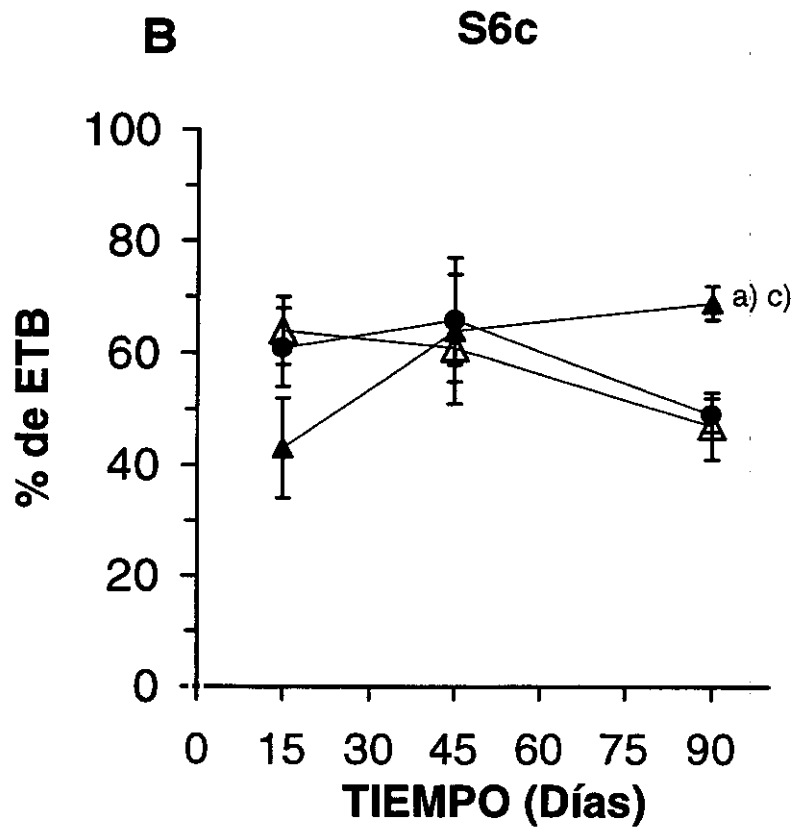
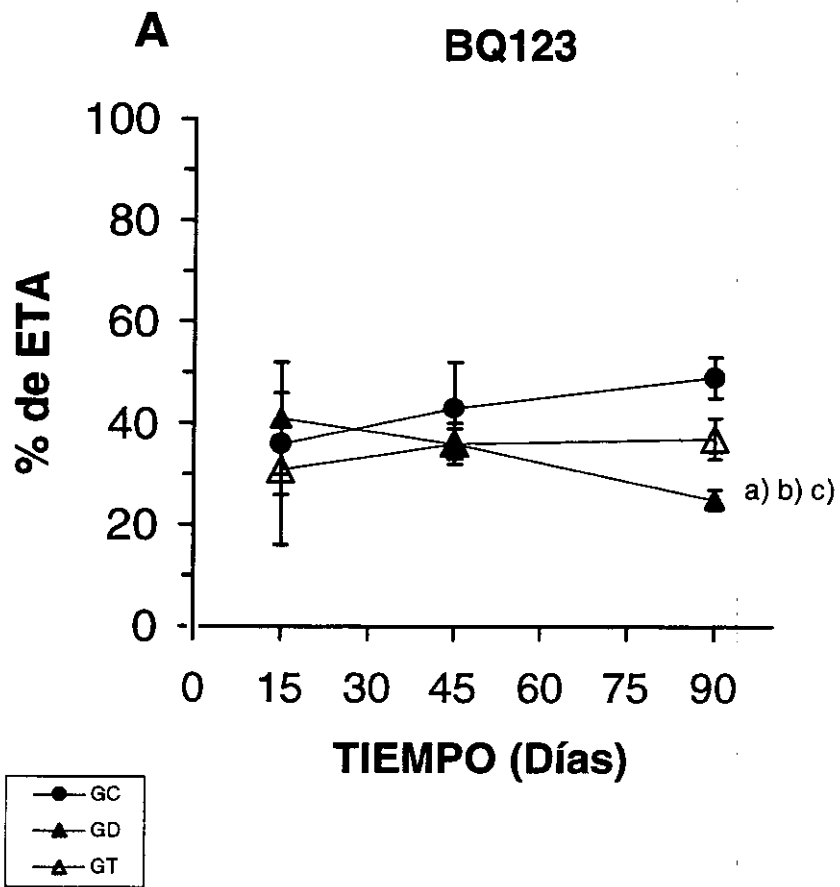
En la misma Fig. 15B, en relación con el tiempo de tratamiento, la proporción de receptores ETB:

- 1) en el GC y en el GT tiende a disminuir, aunque no existe una diferencia significativa entre los tres tiempos estudiados en ambos grupos.
- 2) en el GD aumenta, y es significativamente menor a los 15 días que a los 90 días.

En experimentos de competición, similares a los descritos en los párrafos anteriores, en los que se utilizó <sup>125</sup>I-ET-3, el S6c desplaza totalmente la unión específica de la hormona, mientras que el BQ123 no afecta a dicha unión.



**Fig. 15.-** Representación gráfica de los porcentajes de receptores ETA (gráfica A) y ETB (gráfica B) obtenidos a partir de los experimentos de competición (Tabla II) utilizando <sup>125</sup>I-ET-1 y membranas de retina de los animales del GC (●), del GD (▲) y del GT (△) a los 15, 45 y 90 días de la inducción de la diabetes, en presencia de los análogos específicos BQ123 y S6c. Las barras verticales representan la SEM de cada determinación. <sup>a)</sup> diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto del GC para un mismo tiempo, <sup>b)</sup> diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto del GT para un mismo tiempo, <sup>c)</sup> diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto de los 15 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales, <sup>d)</sup> diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto de los 45 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales (n=4).



Los ensayos de unión de las ETs a sus receptores en las membranas de retina demuestran que existen dos poblaciones de receptores de alta afinidad para estas hormonas en la retina de rata, cuyas características coinciden con los descritos en la bibliografía como receptor tipo A (ETA), con mayor afinidad por la ET-1 que por ET-3 y receptor tipo B (ETB), con igual afinidad por  $^{125}$ I-ET-1 y  $^{125}$ I-ET-3. En los ensayos de saturación se pone de manifiesto que la densidad de receptores para ET-1 es mayor que para ET-3 en todos los grupos de animales, esto es debido a que la  $^{125}$ I-ET-3, en las condiciones en que se realizan estos ensayos, sólo se une a los receptores ETB, puesto que presenta una baja afinidad por los ETA. Por tanto, los receptores que se ponen de manifiesto en los ensayos de saturación usando  $^{125}$ I-ET-3 son receptores, en su práctica totalidad, de tipo ETB, mientras que los que se detectan con la  $^{125}$ I-ET-1 corresponden al total de los receptores, es decir, la suma de los receptores ETA y ETB.

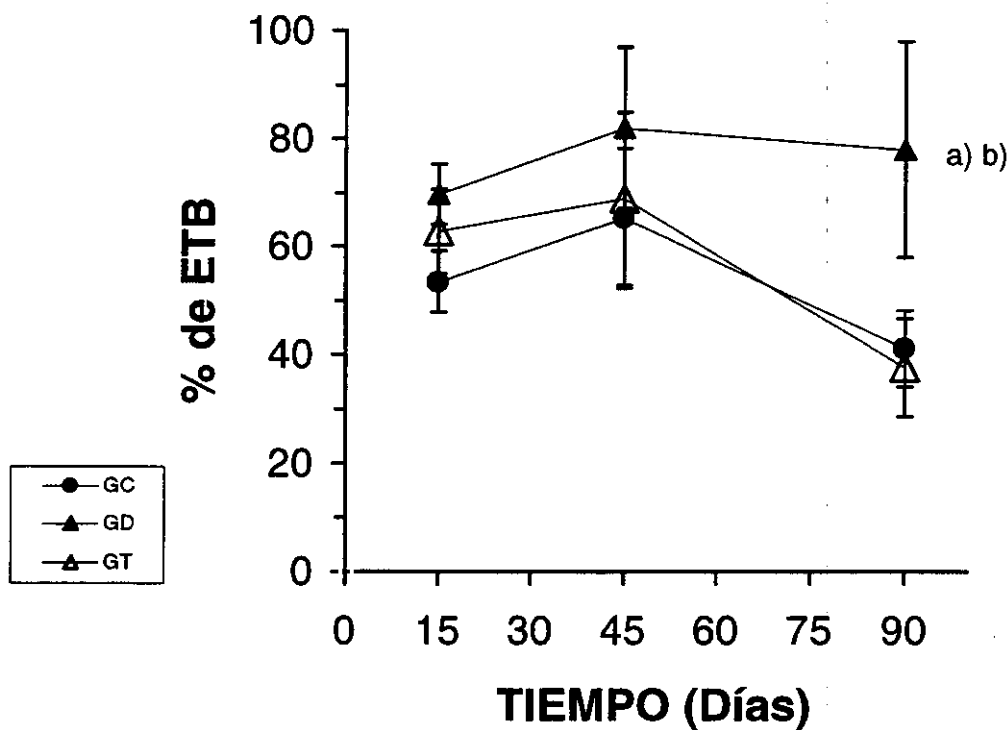


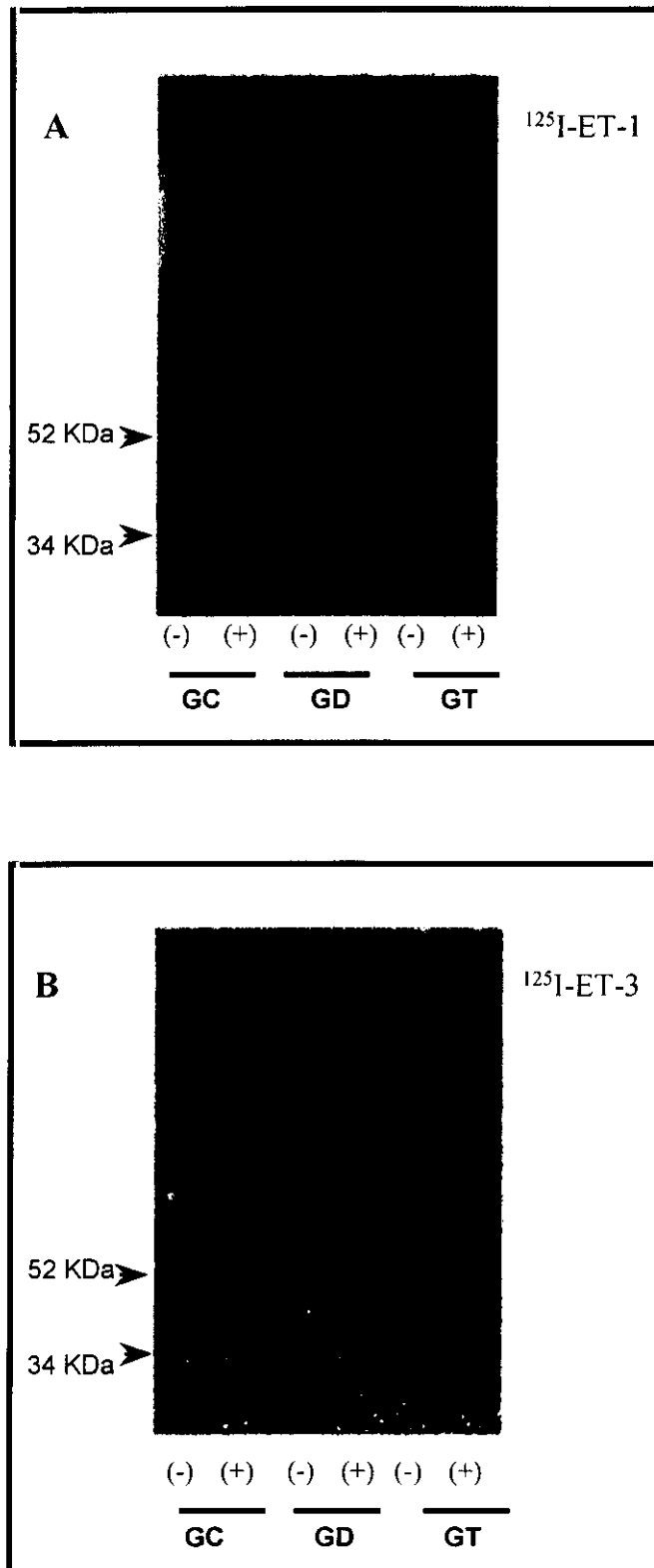
Fig. 16.- Porcentaje de receptores ETB en las membranas de retina de las ratas del GC (●), del GD (▲) y del GT (△). a los 15, 45 y 90 días de la inducción de la diabetes calculados a partir de los experimentos de saturación (se considera que los receptores que se detectan usando  $^{125}$ I-ET-3 son de tipo ETB, y que los que se detectan usando  $^{125}$ I-ET-1 son el total (ETA + ETB) de receptores (n=4). Las barras verticales representan la SEM de cada determinación. <sup>a)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto del GC para un mismo tiempo, <sup>b)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto del GT para un mismo tiempo, <sup>c)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto de los 15 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales, <sup>d)</sup> diferencia significativa (p<0.05) respecto de los 45 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales (n=4).

De esta manera, como muestra la Fig. 16, se puede calcular el porcentaje de receptores ETB a partir de los experimentos de saturación (Tabla I), considerando que los receptores que se detectan usando  $^{125}\text{I-ET-3}$  son tipo ETB, y que los que se detectan usando  $^{125}\text{I-ET-1}$  son el total de receptores (ETA + ETB). Se puede observar como existe una clara analogía entre los porcentajes así obtenidos (Fig. 16) y los conseguidos utilizando los análogos específicos de ambos tipos de receptores (Fig. 15B).

Por tanto, la densidad y la proporción de los dos tipos de receptores de endotelina en las membranas de retina de rata varían por efecto de, al menos, dos factores, la edad y la diabetes, puesto que pueden observarse diferencias significativas tanto dentro de cada grupo con el tiempo de tratamiento, como entre grupos en cada tiempo estudiado. Es especialmente significativo el descenso de la Bmax de la  $^{125}\text{I-ET-1}$  en el GC durante el periodo de tiempo que abarca el experimento, este descenso no se produce en el GT, mientras que en el en el GD la Bmax incluso aumenta. Es importante señalar el descenso de la Bmax de la  $^{125}\text{I-ET-3}$  en el GC y en el GT, mientras que en el GD este parámetro se eleva durante el periodo de tiempo estudiado. Estos cambios en la Bmax implican un cambio en la proporción de sitios de unión para  $^{125}\text{I-ET-1}$  y  $^{125}\text{I-ET-3}$ , que es corroborado por los experimentos de competición usando BQ123 y S6c, en los que se muestra que en el GD aumenta la proporción de ETB durante el periodo que abarca el experimento, siendo significativamente mayor que en el GC y el GT a los 90 días de la inducción de la diabetes.

#### **4.4 UNIÓN COVALENTE DE AFINIDAD DE LA $^{125}\text{I-ET-1}$ Y LA $^{125}\text{I-ET-3}$ A LAS MEMBRANAS DE RETINA.**

Estos experimentos permiten caracterizar, por su peso molecular, las proteínas de las membranas de la retina neural de rata a los que se unen las dos hormonas marcadas que se han utilizado. Como muestra la Fig. 17, la incubación de membranas de retina de los tres grupos de ratas a los 90 días de la inducción de la diabetes con  $^{125}\text{I-ET-1}$  (A) o con  $^{125}\text{I-ET-3}$  (B), seguido de unión covalente de afinidad (cross-linking) con DSS entre la hormona y el receptor, y su posterior electroforesis en geles de poliacrilamida, dio como resultado la aparición, en los tres grupos de animales, de dos bandas específicas a las que corresponde una masa aparente aproximada de 34 y 52 KDa. Las bandas marcadas son específicamente eliminadas cuando la incubación de las membranas se realiza en presencia de ET-1 o ET-3 a una concentración 0.1  $\mu\text{M}$ .



**Fig. 17.-** Unión covalente de afinidad y movilidad electroforética de los sitios de unión de  $^{125}\text{I-ET-1}$  (imagen A) y  $^{125}\text{I-ET-3}$  (imagen B) presentes en las membranas de retina de los animales del GC, del GD, y del GT a los 90 días de la inducción de la diabetes. Las membranas fueron incubadas con hormona marcada ( $^{125}\text{I-ET-1}$  o  $^{125}\text{I-ET-3}$ ), 40 pM, en ausencia (-) o en presencia (+) de 0.1  $\mu\text{M}$  de la hormona no marcada.

## 4.5. MICROAUTORRADIOGRAFÍA.

Estos experimentos fueron diseñados para conocer la distribución de los sitios de unión de la  $^{125}$  I-ET-1 y la  $^{125}$  I-ET-3 en la retina de los tres grupos de ratas a los 90 días de la inducción de la diabetes.

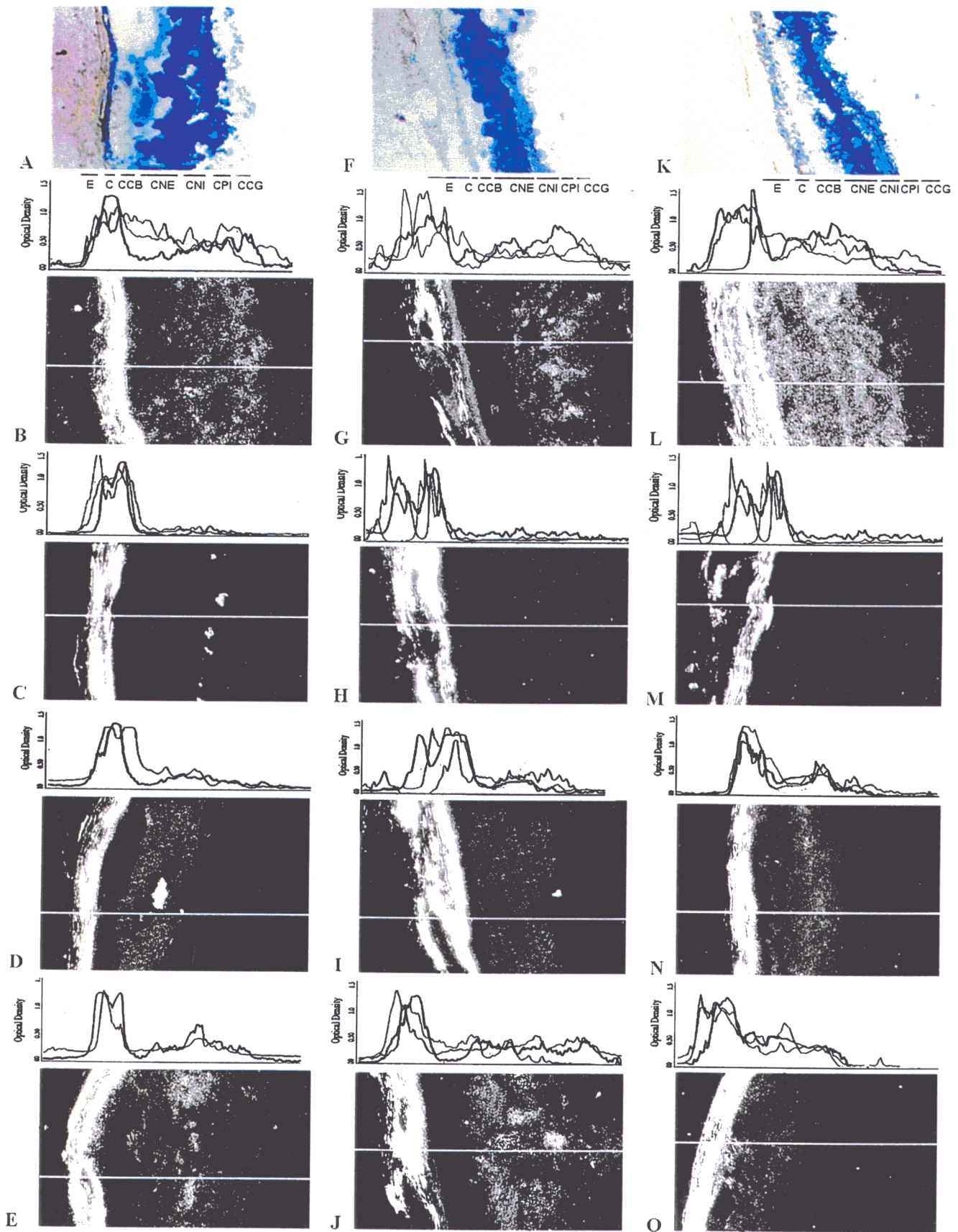
### 4.5.1 SECCIONES INCUBADAS CON $^{125}$ I-ET-1.

Los resultados de los experimentos de microautorradiografía utilizando  $^{125}$  I-ET-1 se reflejan en las Fig. 18, que muestra las imágenes obtenidas con el fotomicroscopio a partir cortes seriados de ojos del GC (Fig. 18 A-E), del GD (Fig. 18 F-J) y del GT (Fig. 18 K-O) a los 90 días de la inducción de la diabetes. En la primera fila (Fig. 18 A,F,K) se muestran las secciones incubadas con  $^{125}$  I-ET-1 40 pM en ausencia de ligandos no marcados, teñidas con azul de toluidina y fotografiadas con el condensador de campo claro; en ellas se señala la situación de la esclerótica (E), la coroides (C) y las distintas capas de la retina. El resto de las imágenes de la Fig. 18 se han fotografiado con el condensador de campo oscuro y encima de cada una de ellas aparece la gráfica con el perfil de densidad óptica conseguido sobre una línea perpendicular a la retina en cada una de las secciones (ver sección 3.4.6.4 de Materiales y Métodos). Cada uno de los tres perfiles que acompañan a cada fotografía pertenece a un experimento independiente. De los tres, el representado por la línea más gruesa, es el obtenido sobre la línea blanca marcada en la fotografía de campo oscuro que aparece en la figura.

Puede observarse que existe un claro paralelismo entre los tres perfiles de densidad óptica en todas las figuras, lo que indica que los resultados obtenidos en los tres experimentos son similares. En todas las imágenes de campo oscuro, la esclerótica aparece muy brillante aunque apenas presenta granos de plata, debido a que las fibras de este tejido reflejan intensamente la luz del condensador de campo oscuro. En todos los casos, la coroides presenta una densidad elevada de granos de plata sin diferencias relevantes entre los tres grupos.

En las secciones incubadas con  $^{125}$  I-ET-1 40 pM en ausencia de ligandos no marcados procedentes del GC (Fig. 18 B), los granos de plata aparecen distribuidos sobre todas las capas de la retina siendo más abundantes en las capas más internas: la capa de núcleos interna (CNI), la capa plexiforme interna (CPI) y en la capa de células ganglionares (CCG).

**Fig. 18.-** Localización mediante microautorradiografía de los sitios de unión para  $^{125}$ I-ET-1 en secciones consecutivas de los ojos de las ratas del GC (A-E), del GD (F-J), y del GT (K-O) a los 90 días de la inducción de la diabetes. Todas las secciones fueron incubadas con  $^{125}$ I-ET-1 (40 pM). Las secciones incubadas en ausencia de ligandos no marcados (B,G,L) muestran la localización del total de los sitios de unión (receptores ETA+ETB). La incubación de las secciones en presencia de ET-1 0.1  $\mu$ M (C,H,M) elimina casi por completo los granos de plata, indicando que la señal obtenida en el resto de las secciones es específica. En las secciones incubadas en presencia de S6c 0.1  $\mu$ M (D,I,N) los granos de plata muestran la localización de los receptores ETA, mientras que las secciones incubadas en presencia de BQ123 1  $\mu$ M (E,J,O) los granos de plata muestran la situación de los receptores ETB. En la parte superior de cada imagen de campo oscuro aparece una gráfica que muestra el perfil de densidad óptica obtenido sobre una línea que atraviesa perpendicularmente la retina. Cada uno de los tres perfiles corresponde a un experimento independiente, el perfil representado con la línea más gruesa representa la densidad óptica obtenida sobre la línea blanca marcada en la fotografía de campo oscuro que se muestra. Las imágenes de campo claro (A,F,K) se corresponden con las secciones incubadas en ausencia de ligandos no marcados (B,G,L). (E esclerótica, C coroides, CCB capa de conos y bastones, CNE capa de núcleos externa, CNI capa de núcleos interna, CPI capa plexiforme interna, CCG capa de células ganglionares.(80X).





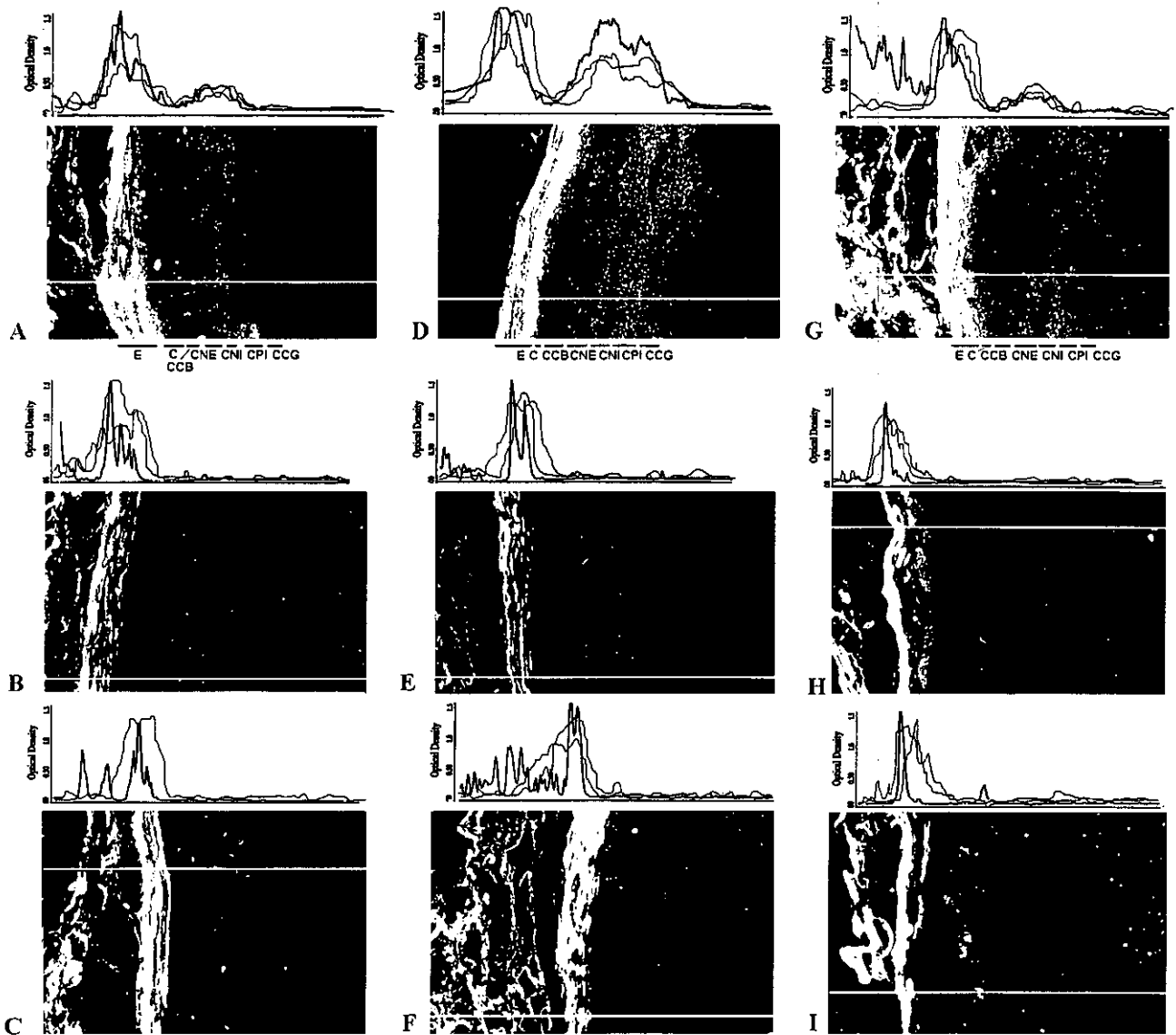
En las secciones procedentes del GD (Fig. 18 G) la distribución de los sitios de unión de la  $^{125}\text{I-ET-1}$  muestra un patrón similar al correspondiente al GC, aunque en la CCG los granos de plata aparecen formando cúmulos. Sin embargo, en las secciones procedentes del GT (Fig. 18 L), a diferencia de lo que ocurre en la retina de los otros dos grupos de ratas, se observa una intensa señal en la capa de conos y bastones (CCB) y en la capa plexiforme externa (CPE). Al igual que ocurre en el GC, en el GT los granos de plata también son muy abundantes en la CCG.

En las secciones adyacentes a las anteriores, incubadas en presencia de ET-1  $0.1\ \mu\text{M}$  (Fig. 18 C,H,M), la adición de hormona no marcada elimina por completo la aparición de los granos de plata, lo que indica que la señal obtenida es específica.

En las secciones incubadas con  $^{125}\text{I-ET-1}$  en presencia de S6c  $0.1\ \mu\text{M}$  (Fig. 18 D,I,N) los granos de plata muestran la localización de los receptores ETA. En las secciones del GC (Fig. 18 D), los granos de plata aparecen distribuidos de forma difusa y homogénea sobre todas las capas de la retina. Una distribución similar se observa en las secciones del GD (Fig. 18 I). Sin embargo, en las secciones del GT (Fig. 18 N), se observa una densa banda de granos de plata extendiéndose entre la CNI y la CCG.

En las secciones incubadas con  $^{125}\text{I-ET-1}$  en presencia de BQ123  $1\ \mu\text{M}$  (Fig. 18 E,J,O) los granos de plata muestran la localización de los receptores ETB. En las secciones correspondientes al GC (Fig. 18 E), la señal aparece difusa sobre la capa de núcleos externa (CNE), la CNI y la CCB, mientras que en la CCG se observan densos cúmulos de granos de plata. En las secciones del GD (Fig. 18 J) la distribución de la señal es similar a la del GC. En las secciones del GT (Fig. 18 O) se observa una difusa cubierta de granos de plata sobre todas las capas de la retina, sin que aparezcan los cúmulos de granos que se observan sobre la CCG en los otros dos grupos de ratas.

En resumen, en la retina del GC los sitios de unión de  $^{125}\text{I-ET-1}$  se detectan en todas las capas, siendo más abundantes los ETB que los ETA. A su vez, mientras los ETA se distribuyen de forma homogénea, los ETB se concentran en las capas más internas de la retina, especialmente en la CCG. En la retina del GD, al igual que en el GC, los ETB son más abundantes que los ETA en las capas más internas de la retina, pero aparecen formando cúmulos en la CCG. Los ETA también aparecen distribuidos de forma homogénea. En la retina del GT los sitios de unión de  $^{125}\text{I-ET-1}$  son más abundantes que en la retina del GC o del GD. Este incremento es debido principalmente al incremento del número de receptores ETA en las capas más internas de la retina.



**Fig. 19.-** Localización mediante microautorradiografía de los sitios de unión de la  $^{125}\text{I}$ -ET-3 en secciones consecutivas de ojos de ratas del GC (A-C), del GD (D-F), y del GT (G-I) a los 90 días de la inducción de la diabetes. Las secciones fueron incubadas con  $^{125}\text{I}$ -ET-3 40 pM en ausencia de ligando no marcado (A,D,G), en presencia de ET-3 0.1  $\mu\text{M}$  (B,E,H) o en presencia de S6c 0.1  $\mu\text{M}$  (C,F,I). Encima de cada imagen de campo oscuro se muestran los perfiles de densidad óptica obtenidos sobre una línea que atraviesa perpendicularmente la retina. Cada uno de los tres perfiles corresponde a un experimento independiente, el perfil representado con la línea más gruesa representa la densidad óptica obtenida sobre la línea blanca marcada en la fotografía de campo oscuro que se muestra. (E esclerótica, C coroides, CCB capa de conos y bastones, CNE capa de núcleos externa, CNI capa de núcleos interna, CPI capa plexiforme interna, CCG capa de células ganglionares. (80X).

#### 4.5.2 SECCIONES INCUBADAS CON $^{125}\text{I-ET-3}$ .

Los resultados de los experimentos de microautorradiografía utilizando  $^{125}\text{I-ET-3}$  40 pM se reflejan en las Fig. 19, que muestra las imágenes obtenidas con el fotomicroscopio a partir cortes seriados de ojos del GC (Fig. 19 A-C), del GD (Fig. 19 D-F) y del GT (Fig. 19 G-I) a los 90 días de la inducción de la diabetes. Como en las secciones incubadas con  $^{125}\text{I-ET-1}$ , la esclerótica aparece muy brillante aunque apenas presenta granos de plata, debido a que las fibras de este tejido reflejan intensamente la luz del condensador de campo oscuro. En todos los casos, la coroides presenta una densidad elevada de granos de plata sin diferencias relevantes entre los tres grupos.

En las secciones procedentes de los tres grupos de ratas, los granos de plata que corresponden a los sitios de unión de la  $^{125}\text{I-ET-3}$  (Fig. 19 A,D,G) aparecen localizados principalmente sobre las capas más internas de la retina: la CNI, la CPI y la CCG. Por otra parte las secciones procedentes del GD (Fig. 19 D) muestran una mayor densidad de granos de plata que las procedentes del GC (Fig. 19 A) y del GT (Fig. 19 G). La unión de la  $^{125}\text{I-ET-3}$  es específica, puesto que la presencia de ET-3 0.1  $\mu\text{M}$  elimina por completo la aparición de los granos de plata (Fig. 19 B,E,H). La incubación de las secciones en presencia de S6c 0.1  $\mu\text{M}$  (Fig. 19 C,F,I), también elimina por completo la aparición de granos de plata, lo que indica que la  $^{125}\text{I-ET-3}$ , a la concentración que se usa en estos experimentos, se une principalmente a los receptores ETB.

Estos experimentos demuestran que la  $^{125}\text{I-ET-3}$  a la concentración utilizada (40 pM) sólo se une a los receptores ETB, por los que tiene elevada afinidad, y que éstos se encuentran localizados principalmente sobre la coroides y la CCG en la retina de los tres grupos de animales.

Estos experimentos señalan que la retina del GD posee mayor número de receptores ETB que la retina del GC o del GT.

#### 4.6 MEDIDA DE LA ET-1 INMUNORREACTIVA.

La tabla III muestra los valores de ET-1-IR presentes en el plasma de las ratas de los tres grupos de ratas a los 15, 45 y 90 días de la inducción de la diabetes.

TABLA III. ET-1-IR (pg/ml) EN EL PLASMA DE LAS RATAS

	TIEMPO TRAS LA INDUCCIÓN DE LA DIABETES		
	15 DÍAS	45 DÍAS	90 DÍAS
RATAS CONTROLES (GC)	5.7 ± 0.6	4.9 ± 0.4	4.9 ± 0.3
RATAS DIABÉTICAS (GD)	5.6 ± 0.7	5.5 ± 0.4	6.8 ± 0.3 <sup>a) b)</sup>
RATAS TRATADAS (GT)	4.9 ± 0.5	4.5 ± 0.3	4.8 ± 0.3

**Tabla III.** - Valores de ET-1 inmunorreactiva en el plasma de las ratas del GC, del GD y del GT a los 15, 45 y 90 días de la inducción de la diabetes. Los datos (pg/ml) son la media ± SEM. <sup>a)</sup> diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto del GC para un mismo tiempo, <sup>b)</sup> diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto del GT para un mismo tiempo, <sup>c)</sup> diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto de los 15 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales, <sup>d)</sup> diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto de los 45 días de la inducción de la diabetes dentro del mismo grupo de animales ( $n=12$ ).

La concentración plasmática de ET-1-IR no varía significativamente ( $p < 0.05$ ) con el tiempo en el GC y el GT. Sin embargo, en el GD, a los 90 días de la inducción de la diabetes, los valores de ET-1-IR son significativamente superiores a los del GC y GT.

## **5. DISCUSIÓN**

## 5 DISCUSIÓN.

Este trabajo muestra, mediante ensayos de unión ligando-receptor, la existencia de sitios de unión de alta afinidad para las endotelinas en la retina neural de rata. Nuestros resultados indican que estos sitios de unión coinciden en sus características con las de los dos tipos de receptores clonados en distintas especies de vertebrados (Arai y col., 1992; Sakurai y col., 1992), denominados ETA y ETB. También demostramos, mediante el clásico modelo experimental de diabetes inducida con STZ, que la densidad y la proporción de receptores ETA y ETB en la retina neural de las ratas diabéticas, se encuentra alterada en comparación con las ratas controles, y que el tratamiento con insulina no revierte totalmente dichas alteraciones. Es importante resaltar que estos sitios de unión se encuentran situados en la retina neural, puesto que las preparaciones de membranas de retina que se utilizan para este tipo de estudios, realizados según el método descrito por Zahniser y col. (1984), están libres de contaminación vascular. La ausencia, en nuestras preparaciones de membranas, de inmunorreactividad frente al factor VIII de coagulación, un marcador de células endoteliales, corrobora estos resultados.

El análisis de Scatchard de los resultados de los experimentos de saturación revela la existencia de sitios de unión de alta afinidad, con una  $K_d$  entre 30 y 50 pM, tanto para la ET-1 como para la ET-3, en los tres grupos de ratas (controles, diabéticas, y diabéticas tratadas con insulina) y a los tres tiempos estudiados (15, 45, y 90 días después de la inducción de la diabetes con STZ). La identificación de un sólo sitio de unión en los experimentos de saturación es, sin embargo, compatible con la existencia de dos poblaciones distintas de receptores de las endotelinas en las membranas de retina, debido a las características de estos receptores. La ET-1 presenta una afinidad similar por los dos tipos de receptores localizados en los tejidos de los mamíferos, por lo que la transformación de Scatchard de los experimentos de saturación utilizando  $^{125}$ I-ET-1 refleja curvas monofásicas, aunque se encuentren presentes en el tejido los dos tipos de receptores. La ET-3 presenta baja afinidad por el ETA, habiéndose calculado una  $K_d$  de aproximadamente 10 nM en la retina de ratas normales, y alta afinidad por el ETB, con una  $K_d$  de 40 pM (De Juan y col., 1995). En nuestros experimentos de saturación se usa un rango de concentraciones de  $^{125}$ I-ET-3 entre 2 y 150 pM y, a estas concentraciones, la hormona marcada se une mayoritariamente a sus receptores de alta afinidad, los ETB, mientras que los receptores de baja afinidad, los ETA, quedan

prácticamente vacíos. Debido a esto, en los experimentos de saturación usando  $^{125}\text{I-ET-3}$ , los resultados de la transformación de Scatchard se ajustan a un modelo de un único sitio, puesto que sólo se detectan los receptores tipo ETB. En la mayor parte de los trabajos que aparecen en la bibliografía, en los que se usan bajas concentraciones de  $^{125}\text{I-ET-3}$ , los ensayos de saturación revelan la existencia de un sólo sitio de unión para ET-3; sin embargo, Ishikawa y col. (1991) utilizando un amplio rango de concentraciones de  $^{125}\text{I-ET-3}$  (de entre 0.01 y 5 nM) detectan, mediante ensayos de saturación en membranas de corazón de rata, la existencia de dos sitios de unión para la ET-3, uno de baja afinidad que coincide con las características del receptor ETA, y otro de alta afinidad que coincide con las características del receptor ETB. En la misma línea, pero utilizando técnicas de microautorradiografía, McCumber y col. (1994) han puesto de manifiesto la existencia de receptores tipo ETA en la retina humana utilizando la capacidad de la ET-3, a bajas concentraciones, para desplazar a la  $^{125}\text{I-ET-1}$  de los receptores ETB, sin afectar a la  $^{125}\text{I-ET-1}$  unida a los receptores ETA. En consecuencia, es evidente que los experimentos de saturación usando  $^{125}\text{I-ET-1}$  permiten estudiar el total de los receptores de endotelinas (ETA + ETB), mientras que los experimentos de saturación usando  $^{125}\text{I-ET-3}$  permiten caracterizar solamente los receptores ETB. Por otra parte, la utilización de los análogos específicos S6c (un agonista del receptor ETB) y BQ123 (un antagonista del receptor ETA), en experimentos de competición por los sitios de unión de la  $^{125}\text{I-ET-3}$ , en los que la  $^{125}\text{I-ET-3}$  es totalmente desplazada por la S6c mientras que el BQ123 no afecta a la unión de la hormona marcada, demuestra que la ET-3 actúa, a las concentraciones adecuadas, como un ligando específico de los receptores ETB, con la ventaja sobre estos análogos de que se trata de un ligando endógeno de los receptores estudiados.

Los resultados que hemos obtenido al calcular el valor de la  $K_d$  de las dos hormonas marcadas en las membranas de retina de los tres grupos de ratas, son similares a los previamente obtenidos en nuestro laboratorio en las membranas de retina de ratas normales (De Juan y col., 1993; y 1995), y en corteza cerebral humana (Fernandez-Durango y col., 1994), así como en otros tejidos como cerebelo de rata (Williams y col., 1991), riñón humano y de rata (Davenport y col., 1989), y corazón de rata (Katwa y col., 1993). Otros autores, sin embargo, han calculado valores de  $K_d$  en el rango nM para los receptores de la  $^{125}\text{I-ET-1}$  y la  $^{125}\text{I-ET-3}$  en esos mismos tejidos (ver Lovenger y col., 1990, para revisión). El análisis de Scatchard en los experimentos de saturación de estos trabajos, se traduce también en curvas monofásicas que reflejan la

existencia de un sólo sitio de unión para la ET-1 y la ET-3. Estas discrepancias en la afinidad de los receptores de las endotelinas, que se observan en los resultados de distintos autores, parecen ser debidas a la técnica utilizada y a las condiciones de incubación, y no a la existencia de otros receptores diferentes de los dos tipos que han sido clonados en los tejidos de los mamíferos.

Una interesante característica de estos péptidos es la lenta disociación de las endotelinas de sus receptores en la mayoría de los tejidos estudiados (Hirata y col., 1988; Lovenberg y col., 1990; De Juan y col., 1993), que algunos autores han relacionado con su prolongada acción vasoconstrictora (Sirvio y col., 1990). Por este motivo, Wagonner y col. (1992) sugieren que no se debe asumir que en la unión de las endotelinas a sus receptores se alcanza el equilibrio químico, al menos en las condiciones de incubación comúnmente usadas. Estos autores proponen que, para definir los parámetros característicos del sistema de las endotelinas, es más correcto aplicar un análisis cinético de la interacción ligando-receptor, estimando el valor de la  $K_d$  a partir de las constantes cinéticas  $K_{+1}$  y  $K_{-1}$ , que aplicar un análisis al equilibrio y estimar el valor de la  $K_d$  mediante el análisis de Scatchard. Sin embargo, todos los grupos de investigación referidos en la bibliografía utilizan el análisis de Scatchard para caracterizar los receptores de estos péptidos, sin duda con el objeto de poder comparar sus resultados con los previamente publicados, aunque es evidente que las condiciones de incubación pueden variar substancialmente el valor de los parámetros calculados.

Los experimentos de microautorradiografía demuestran que los sitios de unión específica para  $^{125}\text{I}$ -ET-1 en la retina de los animales del grupo control, aunque aparecen sobre todas las capas, se concentran principalmente en la coroides y en las capas más internas de la retina (capa de células ganglionares y capa plexiforme interna). Utilizando los análogos específicos S6c y BQ123 se pone de manifiesto que, tanto los receptores ETA como los ETB, aparecen sobre todas las capas de la retina, y que mientras los receptores ETA aparecen distribuidos de una manera homogénea, los receptores ETB se concentran mayoritariamente sobre la coroides y la capa de células ganglionares. La utilización de los análogos también pone de manifiesto que existe una mayor abundancia de los receptores ETB que ETA en todas las capas de la retina. De acuerdo con estos resultados, en el grupo control, los sitios de unión para  $^{125}\text{I}$ -ET-3, que indican la presencia de receptores ETB, se distribuyen sobre todas las capas de la retina apareciendo con mayor densidad sobre la coroides y las capas más internas de la retina, especialmente sobre la capa de células ganglionares. McCumber y col. (1994) usando



una metodología similar a la que nosotros empleamos, aunque sin utilizar análogos específicos de los dos tipos de receptores, sobre secciones de ojos de conejo albino y ojos humanos, sugieren que los receptores ETA se encuentran principalmente asociados a los vasos de la coroides y de las capas internas de la retina, mientras que los receptores ETB están situados principalmente sobre las capas de la retina que no presentan vasos. Por otra parte, Sitt y col. (1996) han demostrado, en ojos humanos y de rata, mediante autorradiografía usando  $^{125}\text{I-ET-1}$  y  $^{125}\text{I-ET-3}$  que ambos tipos de receptores aparecen en todas las capas de la retina, que los vasos de la coroides y de la retina presentan ambos tipos de receptores, y que en la capa de células ganglionares son muy abundantes los receptores ETB. Nuestros resultados, en parte de acuerdo con los de Sitt y col. (1996), muestran que la distribución de los receptores de las endotelinas en la retina de rata es más compleja que la descrita por McCumber y col., (1994), ya que utilizando la S6c y BQ123 probamos la presencia de ETA y ETB sobre la coroides y la capa de células ganglionares, que son capas vasculares en la retina de rata. En resumen, estas dos capas deben presentar ambos tipos de receptores de las endotelinas, aunque posiblemente están situados en distintos tipos de células, predominando el ETA sobre las células vasculares, mientras que el ETB es más frecuente en las células gliales y en las neuronas.

En este trabajo establecemos la presencia de ET-1-IR en la retina de las ratas controles mediante técnicas de inmunohistoquímica en secciones del ojo, apareciendo marcadas por la inmunotinción la capa de núcleos interna y la capa de células ganglionares, así como la coroides. Numerosos autores han verificado la presencia de las endotelinas en la retina. Se han detectado ET-1-IR y ET-3-IR por radioinmunoanálisis en extractos de retina humana, y de rata (McCumber y col., 1991; De Juan y col., 1993 y 1995; Chakravarthy y col., 1994). Igualmente, se ha detectado la expresión del ARNm de estos péptidos en la retina de rata y humana (McCumber y col., 1989; Chakravarthy y col., 1998). Mediante técnicas de inmunohistoquímica, Wollesak y col. (1997) han localizado ET-1-IR en los vasos de la retina humana y en el nervio óptico, pero no en la retina neural; sin embargo, Sitt y col. (1996) han descrito la presencia de ET-1-IR y ET-3-IR asociadas a los vasos sanguíneos de la retina y, también, en la capa plexiforme interna y en el segmento interno de los fotorreceptores de retina humana y de rata.

Todos estos resultados nos hacen pensar que la ET-1 y la ET-3, al actuar sobre sus receptores, deben realizar una función fisiológica en la retina neural de la rata, que

probablemente sea análoga a la que se ha sugerido para ellos en el sistema nervioso central, donde parecen funcionar regulando la actividad neuronal (McCumber y col., 1989). Diversos trabajos demuestran que las endotelinas activan diferentes procesos en el tejido nervioso. La activación de los dos tipos de receptores provoca la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células nerviosas en cultivo (Reiser y col., 1990), siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  un importante mensajero dentro de las neuronas. Se ha demostrado que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en respuesta a las endotelinas se produce a través de los canales iónicos sensibles a las dihidropiridinas, que están presentes en las neuronas retinianas y que intervienen en la transducción de la señal visual, proceso en el que las endotelinas podrían estar implicadas (Reiser y col., 1990). Por otra parte, se ha descrito la acción despolarizante de las endotelinas en neuronas de la médula espinal *in vivo* (Yoshizawa y col., 1989) y la inhibición de la secreción de neurotransmisores desde las terminales simpáticas (Nakamura y col., 1989). Las células gliales, que cumplen múltiples funciones en el mantenimiento de la homeostasia del tejido neural, también son células diana de las endotelinas, ya que tanto los astrocitos (Ehrenreich y col., 1991), como la microglia (Yamashita y col., 1994) presentan receptores de estas hormonas. De igual manera, se ha comprobado que, en respuesta a las endotelinas, las células gliales liberan NO (Sakurai-Yamashita y col., 1997) y glutamato (Sasaki y col., 1997), dos importantes mensajeros químicos, que regulan el funcionamiento neuronal.

Un hallazgo importante, derivado del análisis de los resultados de nuestros experimentos de saturación y desplazamiento, es que la densidad y la proporción de receptores de las endotelinas en la retina neural de la rata, varía con la edad. En el grupo de ratas controles, la densidad total de receptores de las endotelinas, estimados mediante la  $B_{\text{max}}$  calculada en los experimentos de saturación realizados utilizando  $^{125}\text{I-ET-1}$ , disminuye progresivamente con la edad, siendo significativamente mayor a los 15 que a los 90 días, contados a partir del comienzo del experimento. Este descenso en la densidad de receptores, es debido principalmente a una disminución de la presencia de los receptores ETB, ya que la  $B_{\text{max}}$  en los experimentos de saturación utilizando  $^{125}\text{I-ET-3}$  disminuye durante el periodo de tiempo que abarca el experimento, y también se produce un descenso en el porcentaje de receptores ETB calculado en los experimentos de competición. El significado de este hallazgo es, por el momento, desconocido, aunque Deng y col., (1999) han demostrado que el flujo sanguíneo en la retina de ratas normales de tres meses es significativamente mayor que el que se puede medir,

mediante sonografía Doppler, en ratas normales de 9 meses de edad, lo que, como se discutirá más adelante, puede estar relacionado con la disminución que se produce con la edad en la densidad de receptores ETB en la retina neural. Por otra parte, Vig y col. (1995) mediante experimentos de unión de radio-ligandos, han demostrado que la densidad de los receptores de ET-1 disminuye en las membranas de cerebelo de ratones entre los 5 y los 20 días tras el nacimiento, y sugieren que esta disminución es debida a la degeneración de las neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso. En otros tejidos, como en el tejido vascular de rata, también se ha descrito una disminución en la densidad de receptores de la  $^{125}\text{I}$ -ET-1 entre los 5 y los 60 días de edad (Ishikawa y col., 1991; Gu y col., 1992); como esta variación en el número de receptores va acompañada de una disminución de la respuesta vasoconstrictora a la ET-1 con la edad, Dohi y col. (1990) han propuesto que, en el tejido vascular, el tipo de receptor cuya densidad disminuye con la edad es el ETA, sin embargo, también podría estar implicado en este proceso una disminución de la densidad del receptor ETB, puesto que, posteriormente, se ha demostrado que en algunos vasos sanguíneos este receptor produce también vasoconstricción (McMurdo y col., 1993). Nos parece significativo el hecho de que, de forma análoga a lo que ocurre con los receptores de endotelina en la retina, se hayan descrito cambios en la densidad de los receptores de algunos neuromoduladores en distintas regiones del sistema nervioso, incluyendo a la retina, durante las primeras etapas tras el nacimiento y también en fases adultas en animales de experimentación. Por ejemplo, la densidad de los receptores de la sustancia P y del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) disminuye en la médula espinal de la rata entre los 5 y los 30 días tras el nacimiento (Kar y col., 1995); en el cerebelo de la rata, la densidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos también disminuye durante las dos primeras semanas de vida, y en la retina de rata se ha descrito una disminución de los receptores de somatostatina en los primeros días tras el nacimiento (Sasaki y col., 1997). En ratas adultas, existe una variación con la edad de la densidad de los receptores  $D_1$  de dopamina en varias zonas del cerebro y en la retina (Giorgi y col., 1992). Los autores de estos trabajos coinciden en que las variaciones en la densidad de los receptores de los neuromoduladores con la edad, podrían estar relacionadas con la plasticidad del tejido nervioso, es decir con la capacidad del tejido nervioso para formar nuevas conexiones sinápticas, o eliminar otras innecesarias. Por otra parte, también está por determinar si la disminución en la densidad de los receptores de endotelina que observamos en nuestro estudio, es debida a una disminución en el número de células que expresan receptores de endotelina, o bien,

tiene su origen en una disminución del número de receptores por célula, en cuyo caso, podría ser causada por un descenso de la expresión de estos receptores, o por un incremento en la tasa de su degradación. La posibilidad de que el descenso en la densidad de receptores de endotelina con la edad sea debido a una disminución en el número de células de la retina, está apoyada por numerosos trabajos que reflejan que, en la rata y otros animales de experimentación, la densidad de células de la retina disminuye con la edad. En la rata se ha caracterizado un descenso del 30% en la densidad de la capa de núcleos interna y del 50% en la capa de núcleos externa en el periodo transcurrido entre el primer mes tras el nacimiento y los 36 meses de edad (Weisse y col., 1990). En el mismo periodo de tiempo, hay un descenso continuado de la densidad celular en la capa de células ganglionares similar al de la capa de núcleos interna (Weisse y col., 1990). La capa de conos y bastones de la rata, también se ve afectada por una pérdida de los fotorreceptores entre los 12 y los 25 meses de edad (O'Steen y col., 1990). En la retina de conejo, las células gliales, astrocitos y células de Muller, disminuyen en número tras el nacimiento (Reichenbach y col., 1991). La desaparición de células en la retina con la edad es principalmente debida a la apoptosis de los diversos tipos celulares y se ha relacionado con la pérdida de agudeza visual tan característica del envejecimiento (Weale, 1989). Los factores que producen la activación del programa genético que da lugar a la muerte de estas células es, por el momento, parcialmente desconocido, sin embargo, puesto que las endotelinas tienen una acción mitogénica, y por tanto, actúan regulando el ciclo celular, podrían estar implicadas en estos procesos.

Al comparar los resultados obtenidos en los animales del grupo control con los del grupo diabético y los del grupo tratado con insulina, se observa que la densidad, la proporción y la distribución de los receptores de las endotelinas se encuentran alteradas por efecto de la diabetes inducida con STZ, y que el tratamiento con insulina no consigue corregir por completo estas alteraciones. Al analizar los resultados de los experimentos de saturación utilizando  $^{125}\text{I-ET-1}$  y  $^{125}\text{I-ET-3}$ , a los 15 días de la inducción de la diabetes, se observa que la densidad de receptores totales y de receptores ETB es significativamente menor en el grupo de ratas diabéticas que en el grupo control de la misma edad. Sin embargo, la proporción de ambos tipos de receptores no se ha alterado en el grupo diabético, en comparación con el grupo control, lo que sugiere que la densidad de ambos tipos de receptores disminuye en la misma proporción. Estos resultados indican que la densidad de receptores de las endotelinas

disminuye en los primeros días tras la inducción de la diabetes, debido posiblemente a las alteraciones metabólicas producidas por la diabetes. El mismo efecto se ha detectado en las membranas de tejido cardíaco de ratas, a los 3 días de la inducción de la diabetes con STZ, donde se produce una disminución de la densidad de los receptores de  $^{125}\text{I}$ -ET-1 (Nayler y col., 1989). En la retina de las ratas diabéticas, este fenómeno podría ser una respuesta al incremento de la producción de ET-1 que Takagi y col. (1996) han demostrado que existe a los 15 días de la inducción de la diabetes con STZ, puesto que es conocido que la densidad de receptores de endotelina disminuye al aumentar la concentración de su ligando (Ramarchandan y col., 1993). El RIA de ET-1 en el plasma de las ratas que hemos realizado en nuestro estudio, no detecta una diferencia significativa en la concentración plasmática de ET-1 entre los animales diabéticos y controles a los 15 días de la inducción de la diabetes, lo que parece indicar que la concentración local de ET-1 tiene una mayor importancia que su concentración plasmática, en el control de la densidad de sus propios receptores en la retina. Esta suposición es consistente con la idea de que las endotelinas actúan en los tejidos de forma autocrina y paracrina (Lovenberg y col., 1990; Ito y col., 1993). También existe la posibilidad de que existan otros factores implicados en la regulación de la densidad de receptores de las endotelinas en la retina neural de rata durante la diabetes. Por otra parte, a los 45 y a los 90 días tras la inducción de la diabetes, existe un incremento significativo de la densidad de los receptores totales de ET en las membranas de la retina de las ratas diabéticas en relación con el grupo control, que se debe principalmente al aumento en la densidad de los receptores ETB, como lo demuestran los experimentos de saturación. También los experimentos de competición utilizando los análogos específicos prueban estos cambios en el grupo diabético, puesto que, a los 45 y a los 90 días, usando BQ123 se detecta una disminución significativa de la proporción de los receptores ETA, mientras que usando S6c se observa un incremento significativo de los receptores ETB, respecto del grupo control. Nuestros resultados difieren parcialmente de los de Chakrabarti y col. (1998), que han detectado un incremento en la expresión del ARNm de la ET-1, de la ET-3, y de los receptores ETA y ETB en la retina completa de ratas diabéticas de la cepa BB/W a los 6 meses del inicio de la enfermedad, en comparación con ratas controles de la misma edad. Los mismos autores (Deng y col., 1999) han demostrado recientemente que en la retina de ratas con diabetes inducida con STZ se produce un incremento de la expresión del ARNm del receptor ETA sin que varíen los niveles del ARNm del receptor ETB, a la vez que se

produce una disminución del flujo sanguíneo retiniano transcurrido un mes desde la inducción de la diabetes; sin embargo, a los seis meses del inicio de la patología se produce un aumento de la expresión del ARNm de los dos tipos de receptores y un aumento del flujo sanguíneo en la retina. Las diferencias entre nuestros resultados y los de estos autores pueden ser debidas a que la edad de los animales estudiados es diferente, a que la metodología utilizada es distinta y, por último, a que estos autores analizan la retina completa mientras que en nuestros experimentos de unión de radioligandos eliminamos el tejido vascular de la retina. El incremento de la densidad de los receptores ETB se ha podido observar también en membranas de células prostáticas (Saito y col., 1996a) y de los "vasa deferens" (Saito y col., 1996b) de ratas que se mantuvieron diabéticas 48 días. El incremento de la densidad de receptores ETB en la retina neural de las ratas diabéticas podría ser una respuesta compensatoria de este tejido a las condiciones fisiopatológicas características de la fase de la diabetes en que se encuentran los animales utilizados, ya que los receptores ETB estimulan la producción de óxido nítrico (NO) (Yanagisawa y col., 1988a; De Nucci y col., 1988), un factor que produce vasodilatación de los vasos de la retina (Deussen y col., 1993); de esta manera, el tejido estaría respondiendo a la disminución del flujo sanguíneo que se produce en las fases tempranas de la diabetes en la retina. Al tratarse de una sustancia difusible, el NO producido por una célula puede actuar sobre otras que se encuentren próximas, siendo de esta manera como ejerce su función vasorreguladora; así el NO producido por las células endoteliales difunde hasta las células del músculo liso vascular provocando su relajación (Kuo y col., 1995). Se ha demostrado que el NO producido por las células nerviosas regula el flujo sanguíneo en el sistema nervioso central (Kuo y col., 1995) y en otros tejidos (Vanderwinder y col., 1992; Billiar, 1995). También se ha podido comprobar que las células gliales actúan como reservorio de L-Arginina (el sustrato a partir del cual se sintetiza el NO) para las neuronas, a la vez que producen NO (Aoki y col., 1991). Todos estos datos, en conjunto, indican que tanto el NO liberado por las células endoteliales como el procedente de las células nerviosas contribuye al control del tono vascular en el sistema nervioso, regulando por tanto, el flujo sanguíneo. En relación con la anterior suposición, Roufail y col. (1998) han demostrado que el número de neuronas de la retina que contienen óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) es significativamente menor en las ratas diabéticas que en las ratas controles de la misma edad entre 1 y 32 semanas desde la inducción de la diabetes con STZ, sugiriendo que la desaparición de estas neuronas podría contribuir a las alteraciones que se producen en el

tejido neural durante la diabetes. A la vista de nuestros resultados, el incremento en la densidad de los receptores ETB en las membranas de la retina neural podría constituir una vía para contrarrestar la deficiencia de NO que se produce en la retina diabética.

Sin embargo, también se sabe que una excesiva o una prolongada exposición de las neuronas al NO, producido por la activación de los receptores neuronales de los aminoácidos activadores, tiene un efecto tóxico sobre las propias células nerviosas (Dawson y col., 1991), por lo que se ha sugerido que la excesiva formación de NO podría ser la causa de la muerte de las neuronas que ocurre en el accidente cerebrovascular, que se produce como consecuencia de la isquemia y la anoxia cerebral (Berdt y col., 1990). De acuerdo con esta idea, se ha comprobado que en situaciones de isquemia, las células del tejido nervioso aumentan la expresión de la nNOS (Zhang y col., 1993) e incrementan la producción de NO (Endoh y col., 1993). Por otra parte, en ratones deficientes en el gen de la nNOS, los daños producidos por la isquemia cerebral se reducen en comparación con ratones controles (Huang y col., 1994), mientras que en ratones deficientes para el gen de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) se incrementan los daños producidos por la isquemia cerebral (Huang y col., 1996). Por este motivo, Kuo y col. (1995) han propuesto que el NO resulta beneficioso en los primeros instantes tras la isquemia cerebral, al provocar vasodilatación y un aumento del flujo sanguíneo, sin embargo, resulta una sustancia neurotóxica si las células nerviosas sufren una exposición prolongada a este factor. Por otra parte, el espacio que queda en el tejido cerebral por la destrucción de las neuronas es ocupado mediante la proliferación de células gliales que emigran desde otras áreas y, como han demostrado Sakurai-Yamashita y col., (1997) utilizando técnicas de autorradiografía con  $^{125}\text{I-ET-1}$ , en esas células gliales se produce una sobreexpresión de los dos tipos de receptores de endotelina, y una elevada expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS). Los mismos autores demuestran, mediante técnicas de inmunohistoquímica, que las zonas del tejido nervioso dañadas por la isquemia presentan elevadas concentraciones de ET-1-IR, por lo que en esas regiones podrían producirse elevadas cantidades de NO que podrían afectar a otras áreas adyacentes. El efecto tóxico del NO sobre las células nerviosas parece ser debido (Kuo y col., 1995) a que un exceso en su síntesis produce el agotamiento en las células del NADPH, que es el coenzima que utiliza la NOS, y se ha señalado que en la diabetes, este efecto se vería acentuado (Williamson y col., 1993), porque la hiperglucemia incrementa la actividad de la aldosa reductasa que también consume NADPH. En la retina de rata se ha demostrado por técnicas de

inmunohistoquímica la presencia de nNOS (Pérez y col., 1995, Roufail y col., 1998), y en la retina de ratón se ha observado que la sobreestimulación de la nNOS, por efecto del glutamato o cuando la retina es sometida a condiciones de hipoxia por oclusión arterial, está directamente implicada en la destrucción de las células ganglionares (Vorwerk y col., 1997). Por tanto, considerando los resultados de todos los trabajos anteriormente citados y los que nosotros hemos obtenido, podríamos sugerir que, en la retina de las ratas diabéticas el supuesto aumento de la síntesis de NO, producido por el incremento de la densidad de receptores ETB podría llegar a ejercer un efecto tóxico sobre las células nerviosas de la retina, de forma análoga a lo que ocurre en el tejido cerebral. De acuerdo con esta suposición, se ha descrito un incremento en la frecuencia de la apoptosis en las células del tejido nervioso de la retina, tanto en la diabetes experimental en la rata, como en la diabetes mellitus en humanos (Barber y col., 1998). Este incremento se ha detectado tan sólo un mes después de la inducción de la diabetes con STZ en la rata y se mantiene durante al menos doce meses, lo que sugiere que la desaparición acelerada de las células neurales de la retina se produce poco después del inicio de la diabetes experimental y que la neurodegeneración debe ser considerada un componente de la retinopatía diabética.

Otra posible explicación para el incremento de receptores ETB en la retina neural de las ratas diabéticas, que no excluye la expuesta en los párrafos anteriores, es que el receptor ETB funcione como un receptor de aclaramiento, retirando el exceso de ET-1 presente en los tejidos de los animales diabéticos, ya que se ha demostrado que cuando la concentración de ET-1 en los tejidos aumenta, el exceso es eliminado por un mecanismo en el que interviene de forma específica el receptor ETB (Fukuroda y col., 1994; Brunner y col., 1996).

Los resultados de los experimentos de microautorradiografía nos han permitido comparar la distribución de los receptores de las endotelinas en la retina de rata entre los tres grupos de animales. La microautorradiografía no es un método diseñado para cuantificar los receptores de una hormona presentes en un tejido, sino para mostrar la presencia o distribución de esos receptores en el tejido. Sin embargo, existen trabajos en la bibliografía en los que se describen métodos densitométricos que permiten cuantificar los resultados de estos experimentos y por tanto comparar entre tejidos distintos (Baskin y col., 1986; Stone y col., 1996). El análisis densitométrico de los experimentos de microautorradiografía que nosotros realizamos en este trabajo permite fundamentalmente demostrar que la distribución de los sitios de unión para las



endotelinas en la retina de rata es similar en los distintos experimentos, es decir que los resultados son reproducibles, y también permite comparar, de una forma gráfica, los resultados obtenidos en la retina de los tres grupos de animales. Lógicamente, el perfil de densidad óptica varía si la línea sobre la que se ha medido se traslada a lo largo de la retina, pero al estar este tejido organizado en capas, hemos podido comprobar que esos cambios son mínimos si la retina no se encuentra alterada por el proceso de preparación histológica, por lo que si el perfil se hace en una zona en la que la retina mantenga su estructura, es representativo de todos los puntos en que pueda realizarse.

El análisis de los experimentos de microautorradiografía permite detectar alteraciones en la distribución de los receptores de endotelina, en las secciones procedentes de ojos de las ratas diabéticas, en comparación con las del grupo control, a los 90 días de la inducción de la diabetes. En las secciones del grupo diabético incubadas en presencia de  $^{125}\text{I-ET-1}$ , la densidad y distribución de los granos de plata es similar a la descrita en el grupo control, es decir los granos se distribuyen sobre todas las capas de la retina, apareciendo con una mayor densidad sobre la coroides y las capas internas de la retina. También, las secciones incubadas en presencia de BQ123 y S6c muestran una mayor presencia de receptores ETB que de ETA en la retina de las ratas diabéticas a los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ. Sin embargo, en las secciones del grupo diabético incubadas con  $^{125}\text{I-ET-3}$  aparece una mayor cantidad de granos de plata sobre las capas internas de la retina en comparación con el grupo control, lo que sugiere una mayor cantidad de receptores ETB en dichas capas, en las ratas diabéticas. Sullivan y col. (1997) también han descrito un incremento de los receptores ETB en el cuerpo cavernoso de conejo, a los 6 meses de la inducción de la diabetes con aloxano, mediante técnicas de microautorradiografía similares a las que usamos en este trabajo, lo que sugiere que durante la diabetes se producen factores que provocan una sobreexpresión de este receptor en varios tejidos. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en los experimentos de saturación, en los que, previamente, hemos señalado un incremento de la densidad de los receptores ETB en las membranas de la retina neural de las ratas diabéticas, respecto de las controles.

El tratamiento con insulina revierte parcialmente el efecto de la diabetes, ya que, a diferencia de lo que ocurre en las ratas diabéticas, en las ratas tratadas con insulina, a los 15 días de la inducción de la diabetes, la densidad de receptores de  $^{125}\text{I-ET-1}$  es parecida a la del grupo control, y además, entre los 15 y los 90 días tras la inducción de la diabetes, la densidad de receptores de  $^{125}\text{I-ET-3}$  disminuye con el tiempo de forma

paralela a como lo hace en el grupo control; sin embargo, no se observa una disminución en la densidad de receptores para  $^{125}\text{I-ET-1}$ , entre los 15 y los 90 días tras el tratamiento con STZ, como ocurre en el grupo control. La disminución de la densidad de receptores ETB en las ratas tratadas con insulina, a la vez que se mantiene más o menos constante la densidad de receptores totales implica un aumento de los receptores ETA en este grupo de animales en comparación con el grupo control. En los experimentos de competición con los análogos específicos, aunque existe una mayor proporción de receptores ETA en el grupo tratado con insulina que en el grupo control, no se detectan diferencias significativas entre la proporción de receptores ETA y ETB. De acuerdo con los resultados de los experimentos de unión de radioligandos, los experimentos de microautorradiografía muestran, en las secciones del grupo de ratas tratadas con insulina, y a diferencia de lo que ocurre en las secciones de las ratas controles, una mayor densidad de receptores ETA que de ETB, y que los receptores ETA predominan sobre la capa de células ganglionares y sobre la capa de conos y bastones.

El incremento de los receptores ETA en la retina de las ratas tratadas con insulina, que muestran los experimentos de unión de radioligandos y de microautorradiografía, podría ser producido directamente por la insulina exógena, ya que esta hormona aumenta la expresión del ARNm del receptor ETA en diversos tipos de células tanto *in vivo* como *in vitro* (Frank y col., 1993). Por otra parte, esta alteración podría ser debida a procesos metabólicos desencadenados como consecuencia de la administración de la insulina, puesto que no está suficientemente claro si la insulina es capaz, o no, de atravesar la barrera hematorretiniana. Existen evidencias de que la insulina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica mediante un mecanismo de transporte mediado por su receptor (Pardridge y col., 1985), sin embargo, no se ha podido demostrar que este mecanismo exista en la barrera hematorretiniana (James y col., 1983). Es interesante resaltar que estudios electrofisiológicos han permitido detectar una alteración del potencial eléctrico de las neuronas retinianas *in vivo* producida por la administración subcutánea de insulina, que sugieren la entrada de esta hormona en la retina desde la sangre (Lansel y col., 1997). El incremento de los receptores ETA en las membranas de las células de la retina neural que se produce en el grupo de ratas tratadas con insulina, podría provocar un aumento de la actividad mitótica de las células de este tejido, puesto que este receptor es el encargado de estimular la mitogénesis en una gran cantidad de células, incluidas las células gliales

(Battistini y col., 1993). En este sentido, es interesante señalar que el incremento en la frecuencia de apoptosis en las células del tejido nervioso de la retina de rata, al mes del inicio de la diabetes experimental, es corregido mediante el tratamiento con insulina (Barber y col., 1998), efecto en el que podría estar implicado el incremento en la densidad de receptores ETA. Por otra parte, se ha comprobado recientemente que las ETs inhiben la apoptosis en fibroblastos en cultivo mediante un mecanismo mediado por el receptor ETA y la activación de *c-myc* (Shichiri y col., 1998).

Robison y col. (1998) han demostrado que, como consecuencia de la diabetes, se producen alteraciones tempranas en la retina que no pueden ser corregidas con el posterior tratamiento de esta patología con insulina, y que terminan por originar las alteraciones vasculares características de las fases posteriores de la retinopatía diabética si la enfermedad perdura lo suficiente. Aunque se desconocen los cambios o los factores que median en este proceso, el incremento de los receptores ETA que detectamos en la retina neural de las ratas tratadas con insulina, podría tener una implicación importante en la progresión de la enfermedad y la insuficiente eficacia del tratamiento. La importancia del receptor ETA en el desarrollo de las complicaciones asociadas a la diabetes ha sido puesta de manifiesto por Nakamura y col. (1996) que, en el riñón de ratas diabéticas, han detectado una sobreexpresión de los genes *c-fos*, *c-myc*, y *c-jun*, que están relacionados con la proliferación celular, y que el tratamiento con un antagonista específico de los receptores ETA, hace que dichos genes se expresen en niveles normales. Por otra parte Ohira y col. (1990), han mostrado que extractos de retina de ratas adultas poseen factores solubles que producen la proliferación *in vitro* de distintos tipos de células, como astrocitos, fibroblastos o células endoteliales, sin embargo los extractos procedentes de retinas isquémicas, en las que se observa un incremento de la proliferación celular *in vivo*, no presentan una mayor actividad mitótica sobre los cultivos celulares, lo que lleva a estos autores a concluir que las causas de la proliferación celular en la retina isquémica no reside solamente en la liberación de factores de crecimiento, sino en otras características del tejido como pueden ser la activación/incremento de la expresión de receptores o la disminución de la presencia de inhibidores de la proliferación celular.

Es importante señalar que, en general, los resultados que hemos obtenido en los experimentos de microautorradiografía son coherentes con los de saturación y competición, pues en ambos se muestra un incremento de los receptores ETB en la retina de las ratas diabéticas y una mayor presencia de receptores ETA en la de las ratas

tratadas con insulina, en comparación con el grupo control, a pesar de que en los experimentos de microautorradiografía está presente el tejido vascular, que, sin embargo, se elimina durante la preparación de las membranas. La alteración de la densidad y la distribución de los receptores en la retina de las ratas diabéticas indica que estos péptidos podrían estar implicados en el desarrollo de las alteraciones que en este tejido se producen durante esta patología. También es significativo el hecho de que el tratamiento con insulina no revierta totalmente las alteraciones que se producen en el sistema de las endotelinas en la retina de rata, indicando, tal vez, que posiblemente estas lesiones se producen muy rápidamente tras la elevación de los niveles de glucosa en sangre, antes de que comience el tratamiento con insulina, y que dan lugar a un proceso irreversible. Existe la posibilidad de que las alteraciones que se observan en el grupo tratado, sean debidas a episodios esporádicos de hiperglucemia que se producen debido a pequeñas alteraciones en la administración de la insulina, y que generan unas condiciones tóxicas en la retina que con el tiempo dan lugar a los procesos patológicos que podemos observar incluso en pacientes humanos “correctamente” tratados con insulina. Es posible que el incremento de los receptores ETA que detectamos en la retina del grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina sea un importante factor en la patogénesis de la microangiopatía retiniana característica de las fases avanzadas de la diabetes.

Las alteraciones que se observan en la distribución de los receptores de endotelina en la retina de los animales diabéticos y tratados con insulina, no son debidas a cambios en la vascularización de la retina puesto que como demuestran los experimentos de inmunohistoquímica no existen diferencias apreciables en la distribución del antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación, entre la retina de estos animales y la de los controles. La ausencia de neovascularización en la retina de ratas diabéticas tratadas con STZ ya ha sido señalada por otros autores (Engerman y col., 1982; Hammes y col., 1998), que la achacan a que estos animales no viven el tiempo suficiente para que tenga lugar este proceso.

Los experimentos de unión covalente de afinidad (cross-linking) con <sup>125</sup>I-ET-1 y con <sup>125</sup>I-ET-3 revelan la existencia de dos bandas con una masa molecular aparente de 52 y 34 KDa en las membranas de los tres grupos de animales a los 90 días del tratamiento con STZ. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por nuestro grupo en la retina de ratas normales (De Juan y col., 1993; 1995) y por otros autores en diferentes tejidos nerviosos (Ambar y col., 1990; Schwartz y col., 1990; 1991). Schwartz

y col. (1990) han demostrado, usando proteasas en el medio de incubación en este tipo de experimentos, que en membranas de cerebelo bovino el polipéptido de 34 KDa es una degradación proteolítica del de 52 KDa. Por otra parte, Kozuka y col. (1991) han purificado y secuenciado parcialmente la banda de menor peso molecular observando que guarda una gran similitud en su secuencia con el receptor clonado por Sakurai y col. (1990). Estos resultados, unidos al hecho de que el peso molecular que corresponde a la banda es similar al peso molecular predicho para los receptores de endotelinas clonados por Arai y col. (1990) y Sakurai y col. (1990), permiten suponer que el polipéptido de 52 KDa debe ser la mezcla de los dos tipos de receptores de las endotelinas presentes en la retina de rata. La aparición del mismo patrón de bandas en los tres grupos de animales indica que en ambos se encuentran presentes el mismo tipo de polipéptidos encargados de la unión a las endotelinas. La unión covalente de afinidad no es un método cuantitativo, ya que sólo el 10% de los receptores presentes en un tejido se unen covalentemente a la hormona yodada en un determinado experimento, y ese porcentaje puede variar incluso dentro de un mismo experimento (Zetterstrom y col., 1992), por lo que no es adecuada la comparación de los resultados obtenidos entre los tres grupos de animales ni entre las dos hormonas yodadas utilizadas.

Las concentraciones plasmáticas de ET-1 valoradas por radioinmunoanálisis a los 90 días del tratamiento con STZ, demuestran que las ratas diabéticas tienen una concentración significativamente mayor que las del grupo control y el grupo tratado con insulina. No existe un acuerdo sobre si los niveles plasmáticos de ET-1 se encuentran elevados durante la DM, puesto que mientras algunos autores han descrito una elevación de la ET-1-IR en el plasma de ratas diabéticas a los tres meses del tratamiento con STZ (Takeda y col., 1991), en otros trabajos no se observa este incremento (Takahashi y col., 1991b). Es posible, que estas discrepancias sean debidas al diferente estado metabólico de los animales objeto de estudio, ya que existe una compleja interrelación entre el sistema de las endotelinas, la insulina y la concentración plasmática de glucosa; estudios *in vitro* han puesto de manifiesto que, por una parte, la insulina activa la síntesis y liberación de ET-1 desde las células endoteliales (Hattori y col., 1991; Oliver y col., 1991), y que, por otra parte, el efecto de la glucosa depende de su concentración, ya que mientras que elevadas concentraciones de glucosa inhiben la liberación de ET-1 (Hattori y col., 1991), a concentraciones ligeramente inferiores la glucosa incrementa la producción de ET-1 desde las células endoteliales (Yamanuchi y col., 1990). También, estudios *in vivo* dan prueba de esta complejidad, pues en ratas

diabéticas tratadas con STZ la expresión del gen de la ET-1 en el riñón, se encuentra reducida y el tratamiento con insulina revierte este proceso (Shin y col., 1995), aunque los niveles plasmáticos de ET-1 son similares en ambos grupos. Por otra parte, la producción basal de ET-1 desde arterias mesentéricas aisladas de ratas diabéticas es superior a la que se produce en las arterias aisladas de ratas normales (Takeda y col., 1991), lo que indica que distintos tejidos parecen responder de manera diferente a las condiciones metabólicas de la diabetes. De acuerdo con los datos del radioinmunoanálisis, los resultados de los experimentos de inmunohistoquímica utilizando el antisuero de conejo anti-ET-1, demuestran que en la retina de las ratas diabéticas existe una mayor cantidad de ET-1-IR que en la de las ratas controles a los 90 días de la inducción de la diabetes, especialmente en las capas más internas de la retina y en la capa de fotorreceptores. Estos resultados son similares a los presentados por Chakrabarti y col. (1997), que también muestran un incremento de la presencia de ET-1-IR en todas las capas de la retina de ratas BB/W de 8 meses con diabetes espontánea. El incremento de la presencia de ET-1-IR en la retina podría deberse a un aumento de la cantidad de ET-1 que se incorpora a la retina procedente de la sangre, aunque también podría ser debida a un incremento de la producción de ET-1 por las células de la retina. Este incremento de la ET-1-IR indica claramente, junto con los cambios en la densidad de sus receptores, que el sistema de las endotelinas está profundamente alterado en la retina diabética. La ET-1-IR en el plasma del grupo de ratas tratadas con insulina a los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ no es significativamente diferente de la del grupo control. Sin embargo, la distribución de ET-1-IR en la retina del grupo de ratas tratadas con insulina, obtenida mediante los experimentos de inmunohistoquímica, no coincide con la que se observa en el grupo control. En el grupo de ratas tratadas con insulina aparece una mayor inmunorreactividad en la capa de conos y bastones y en la capa plexiforme interna que en el grupo control, esta diferencia implica una alteración en la producción de ET-1 en la retina de las ratas tratadas con insulina, que también señala que el tratamiento con insulina no corrige totalmente las alteraciones provocadas por la diabetes en la retina.

Es conocido que los receptores de endotelinas presentes en los vasos retinianos están implicados en la regulación del flujo sanguíneo de este tejido en la rata y otros animales de experimentación (Takei y col., 1993; Meyer y col., 1993; Bursell y col., 1995). También se ha podido demostrar que la ET-1, actuando sobre sus receptores ETA, es responsable del mantenimiento del tono vascular de los vasos de la retina de

rata bajo condiciones fisiológicas normales, y que puede ser la responsable de las alteraciones que se producen en la circulación retiniana en las primeras fases de la diabetes (Bursell y col., 1995; Takagi y col., 1996). En este sentido, se ha podido comprobar que el flujo sanguíneo en la retina se ve alterado durante la diabetes y que las endotelinas juegan una importante función en este proceso, puesto que la inyección intravitreal de ET-1 provoca una disminución del flujo retiniano similar al que se observa en la retina de ratas diabéticas tratadas con STZ (Bursell y col., 1995). Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento de ratas diabéticas con insulina normaliza el flujo sanguíneo en la retina (Clermont y col., 1994). También existen estudios que demuestran que el flujo sanguíneo se ve incrementado en la retina de la rata en fases más avanzadas de la diabetes (Cringle y col., 1993).

Resulta interesante señalar que la hiperglucemia produce una activación de la PKC, debido principalmente a la síntesis *de novo* de DAG a partir de metabolitos procedentes de la glucólisis, y que la PKC media en muchas de las alteraciones que se producen como consecuencia de la diabetes, como los cambios en el grosor de la membrana basal de los vasos, alteraciones de la permeabilidad vascular, y variaciones en el flujo sanguíneo (ver Koya y col., (1998) para revisión). En lo referido a la retina diabética, la activación de la PKC produce una disminución del flujo sanguíneo (Ishii y col., 1996) en la retina de ratas diabéticas. Un mecanismo potencial, por el cual la activación de la PKC provoca vasoconstricción en la retina es mediante el incremento de la expresión del ARNm de la ET-1 puesto que Takagi y col. (1996) han demostrado que sus niveles en la retina se incrementan durante la diabetes, a la vez que han comprobado que el flujo sanguíneo en la retina en estas ratas se incrementa por la inyección intravitreal de BQ123, que antagoniza los receptores ETA, y con el tratamiento con fosforamidón, que es un inhibidor de la ECE-1.

Sin embargo la función de los receptores de endotelinas presentes en la retina neural de la rata, al igual que ocurre con los receptores de estos péptidos presentes en otros tejidos nerviosos, es hasta el momento parcialmente desconocido, aunque sin duda juegan una importante función en la fisiología y la patofisiología de este tejido. Desde un punto de vista funcional, las células de la retina neural podrían regular el flujo sanguíneo en este tejido, puesto que existe una densa red de fibras nerviosas que rodean a los vasos sanguíneos de la retina, y de forma análoga a la propuesta por Lou y col. (1987) para la regulación del flujo sanguíneo en la corteza cerebral, estas fibras podrían segregar neurotransmisores o neuropéptidos implicados en la regulación del tono

vascular de los microvasos retinianos. Las endotelinas, actuando sobre sus receptores, podrían estar implicadas en la regulación del funcionamiento de estas fibras nerviosas que a su vez se encargan de regular el flujo sanguíneo, ya que se ha señalado que las endotelinas ejercen una función como neuromoduladores (Doherty , 1992). De esta manera, es interesante considerar la idea de que el sistema de las endotelinas pueda controlar el flujo sanguíneo por una doble vía: por una parte las endotelinas actuarían directamente sobre los vasos sanguíneos produciendo vasoconstricción al actuar sobre los receptores ETA presentes en las células musculares lisas vasculares y vasodilatación al actuar sobre los receptores ETB presentes en las células endoteliales, y por otra parte actuarían sobre las células nerviosas estimulando la producción de NO y otros factores vasoactivos. Así se conseguiría un estrecho control del flujo sanguíneo y una regulación del aporte de oxígeno y nutrientes a las células. Lógicamente, la alteración del sistema de las endotelinas que, tanto en el componente vascular como en el componente neural de la retina, se produce durante la diabetes experimental debe tener importantes consecuencias en la autorregulación del flujo sanguíneo retiniano, y puede ser uno de los factores implicados en el desarrollo de las alteraciones vasculares y neurales que se producen en la retina como consecuencia de esta patología.

También es interesante considerar la posibilidad, de que la alteración del sistema de las endotelinas en la retina neural de rata que reflejamos en este trabajo, forme parte de un proceso más amplio en el que se encuentren implicados otros factores de crecimiento y péptidos activos que pueden intervenir en los acontecimientos característicos de la retinopatía diabética. En especial, es interesante señalar la íntima relación que parece existir entre las endotelinas y la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), un grupo de péptidos que están directamente implicados en los procesos de angiogénesis en la retina (Aiello y col., 1994; Dvorak y col., 1995). Pedram y col. (1997) han demostrado, que tanto la ET-1 como la ET-3, actuando sobre sus receptores, estimulan la producción de VEGF por las células musculares de los vasos sanguíneos humanos en cultivo; por otra parte el VEGF, activa la expresión de la enzima convertidora de endotelina (ECE-1) en las células endoteliales bovinas en cultivo (Matsuura y col., 1997) provocando un incremento de la presencia de endotelinas en el medio. Si estos procesos tuvieran también lugar en la retina, el incremento de la concentración de endotelinas, podría dar lugar a un sistema de retroalimentación positiva, que incrementaría los niveles de endotelina y VEGF provocando por si sólo la formación de nuevos vasos.



En resumen, las endotelinas están presentes en la retina de rata, tejido en el que deben cumplir una función fisiológica mediante la interacción con sus dos tipos de receptores. Por otra parte, el sistema de las endotelinas se encuentra alterado en la retina a consecuencia de la diabetes inducida con STZ en la rata, puesto que la densidad y la distribución de los receptores ETA y ETB cambia al inducirse esta patología, a la vez que se incrementa la presencia de ET-1-IR en el plasma y en la retina de las ratas diabéticas. Y, por último, el tratamiento con insulina no corrige por completo dichas alteraciones, ya que la densidad y la distribución de las receptores de estos péptidos en la retina de ratas diabéticas tratadas con insulina presenta sensibles diferencias en relación con el de las ratas controles. En consecuencia, las endotelinas al interaccionar con sus receptores deben intervenir en muchos de los procesos que tienen lugar durante el desarrollo de la retinopatía diabética, ya que: a) debido a su efecto vasodilatador/vasoconstrictor están implicadas en las alteraciones del flujo sanguíneo que tienen lugar en la retina, b) puesto que son capaces de modificar la permeabilidad de los vasos sanguíneos, podrían alterar las propiedades de la barrera hematorretiniana, provocando la entrada en la retina de factores que están ausentes, o en distintas concentraciones, en condiciones normales, c) debido a su función como neuromoduladores (es posible, que incluso como neurotransmisores), regulando la fisiología neuronal en la retina, podrían ser responsables de algunas de las alteraciones fisiopatológicas en los procesos de la visión, d) en cuarto y último lugar, al tener un efecto comitogénico sobre diversos tipos de células, podrían perturbar el ciclo celular de las células de la retina, provocando la muerte de algunas células, como los pericitos y las neuronas, y la proliferación de otras, como las células gliales y endoteliales.

## **6. CONCLUSIONES**

## 6 CONCLUSIONES

- 1- Las endotelinas presentan dos tipos de sitios de unión en la retina neural de rata que coinciden en sus características con los previamente descritos en la bibliografía como ETA y ETB.
- 2- La densidad de los sitios de unión para  $^{125}\text{I-ET-1}$  en las membranas de la retina neural de las ratas del grupo control disminuye con la edad, entre los 15 y los 90 días transcurridos desde el comienzo del experimento. Este hecho no se observa en el grupo de ratas diabéticas ni en el grupo de ratas tratadas con insulina.
- 3- En las membranas de retina de las ratas del grupo control y del grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina disminuye la densidad de los sitios de unión para  $^{125}\text{I-ET-3}$ , mientras que en las ratas diabéticas no tratadas este parámetro aumenta entre los 15 y los 90 días transcurridos desde el comienzo del experimento.
- 4- En las membranas de retina neural del grupo de ratas control y en las del grupo de ratas tratadas con insulina aumenta la proporción de receptores ETA, mientras que en el grupo de ratas diabéticas no tratadas aumenta la proporción de receptores ETB entre los 15 y los 90 días transcurridos desde el comienzo del experimento.
- 5- Los dos tipos de receptores de las endotelinas se expresan en todas las capas de la retina en los tres grupos de ratas.
- 6- A los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ, existe una mayor cantidad de receptores ETB en las capas más internas de la retina de las ratas diabéticas que en las de las ratas controles. El tratamiento diario con insulina provoca un incremento de la cantidad de receptores ETA en las capas más internas de la retina.
- 7- Los polipéptidos a los que se unen la  $^{125}\text{I-ET-1}$  y la  $^{125}\text{I-ET-3}$  en las membranas de la retina neural de los tres grupos de ratas, a los 90 días de la inducción de la diabetes con STZ, presentan un parecido peso molecular.

- 8- En las capas internas de la retina y en la capa de conos y bastones de las secciones de retina de las ratas diabéticas se detecta una mayor cantidad de ET-1 inmunorreactiva que en las mismas capas de la retina de las ratas del grupo control. En las secciones del grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina la inmunorreactividad en dichas capas es mayor que en el grupo control pero menor que el grupo de ratas diabéticas.
  
- 9- La concentración de ET-1 inmunorreactiva en el plasma de las ratas diabéticas es significativamente mayor que el detectado en las ratas del grupo control y del grupo tratado con insulina a los 90 días de la inducción de la diabetes.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

## 7 BIBLIOGRAFÍA

Abassi Z, Golomb E, Keiser H. Neutral endopeptidase inhibition increases the urinary excretion and plasma levels of endothelin. *Metabolism* **41** : 683-685 (1992)

Abdel- latif A A, Zhang Y, Yousufzai S. Endothelin 1 stimulates the release of arachidonic acid and prostaglandins in rabbit iris sphincter smooth muscle: activation of phospholipase A2. *Curr Eye Res* **10** : 259-265 (1991)

Adachi M, Yang Y, Trzeclak A C, Furuichi Y, Miyamoto C. Identification of a domain of ETA receptor required for ligand binding. *FEBS Lett* **311** : 179-183 (1992)

Adachi M, Hashido K, Trzeclak A C, Watanabe T, Furuichi Y, Miyamoto Ch. Functional domains of human endothelin receptor. *J Cardiovas Pharmacol* **22 (Suppl. 8)** : S121-S124 (1993)

Aiello L P, Avery L, Arrigg P. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* **331** : 1480-1487 (1994)

Aiello L P, Cavallerano J, Bursell S. Diabetic eye disease. In *Chronic complications of the diabetes. Endocrinology and metabolism clinics of North America* **25** : 271-291 (1996)

Ambar I, Kloog Y A, Sokolovsky M. Cross-linking of endothelin-1 and endothelin-3 to rat brain membranes: identification of the putative receptor(s). *Biochemistry* **29** : 6415-6418 (1990)

Anderson H, Stitt A, Gardiner T, Archer D. Diabetic retinopathy: morphometric analysis of basement membrane thickening of capillaries in different retinal layers within arterial and venous environments. *Br J Ophthalmol* **79** : 1120-1123 (1995)

Ando K, Hirata Y, Togashi K, Kawakami M, Marumo F. Endothelin 1 and endothelin 3 like immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. *J Cardiovascul Pharmacol* **7 (Suppl.)** : S434-S436 (1991)

- Antonelli-Orlidge A, Saunders K B, Smith S R, D'Amore P A. An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 4544-4548 (1989)
- Aoki E, Semba R, Mikoshiba K, Kashiwamata S. Predominant localization in glial cells of free L-arginine: immunocytochemical evidence. *Brian Res* **547** : 190-192 (1991)
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expresion of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348** : 730-732 (1990)
- Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S, Imura H. The human endothelin B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem* **268** : 3463-3470 (1993)
- Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida M, Hamaguchi H. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin 1 gene (EDN1) to 6p23 p24 the endothelin 2 gene (EDN2) to 1p34 and the endothelin 3 gene (EDN3) to 20q13.2 q13.3. *Am J Hum Genet* **48** : 990-996 (1991)
- Ashton N K. Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies. *Br J Ophthalmol* **47** : 521-538 (1963)
- Awazu M, Parker R B, Harvie B, Ichikawa I, Kon V W. Down regulation of endothelin 1 receptors by protein kinase C in streptozotocin diabetic rats. *J Cardiovas Pharmacol* **17 (Suppl 7)** : S500-S502 (1991)
- Badr K, Murray J J, Breyer M, Takahashi K, Inagami T, Harris R. Mesangial cell, glomerular and renal responses to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest* **83** : 336-342 (1989)
- Barber A J, Lieth E, Khin S A, Antonetti D A, Buchanan A G, Gardner T W, and the Penn state retina research group. Neural apoptosis in the retina during experimental and human

diabetes. *J Clin Invest* **102** : 783-791 (1998)

Baskin D, Davison D D, Corp E, Lewellen T, Graham M. An inexpensive microcomputer digital imaging system for densitometry: quantitative autoradiography of insulin receptors with <sup>125</sup>I and LKB ultrafilm. *J Neurosci Meth* **16** : 119-129 (1986)

Battistini B J, Chailier P, D'Orleans-Juste P, Brière N A, Sirois P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* **14** : 385-399 (1993)

Baynash A, Hosoda K, Giaid A J, Richardson J, Emoto N, Hammer R, Yanagisawa M. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79** 1277-1285 (1994)

Benigni A, Colosio V, Brena C, Bruzzi I, Bernati T, Remuzzi G. Selective inhibition of endothelin receptors reduces renal dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes* **47** : 450-456 (1998)

Berbinschi A, Ketelslegers J M. Endothelin in urine. *Lancet* **46** : 8653-8654 (1989)

Berdts D, Hwang P D, Snyder S. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347** : 768-770 (1990)

Billiar T A. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* **221** : 339-349 (1995)

Birnbaumer L, Abramowitz J G, Brown A. Receptor-effector coupling by G-proteins. *Biochem Biophys Acta* **1031** : 163-224 (1990)

Bloch K, Hong C, Eddy R C, Shows T, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin. *Genomics* **10** : 236-242 (1991)

Bodenant C, Leroux P J, Gonzalez B, Vaudy H. Transient expression of somatostatin



- receptors in the rat visual system during development. *Neuroscience* **41** : 595-606 (1991)
- Bresnick G, Engerman R, Davis M, de Venecia G, Myers F. Patterns of ischemia in diabetic retinopathy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **81** : 694-709 (1976)
- Brunner F, Doherty A M. Role of ETB receptors in local clearance of endothelin-1 in rat heart: studies with the antagonists PD155080 and BQ-788. *FEBS Lett* **396** : 238-242 (1996)
- Bursell S, Clermont A, Oren B, King G. The in vivo effect of endothelins on retinal circulation in nondiabetic and diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36** : 596-607 (1995)
- Cade C, Lumma W C Jr, Mohan R, Rubanyi G M, Parker-Botelho L H. Lack of biological activity of preproendothelin [110-130] in several endothelin assays. *Life Sci* **47** : 2097-2103 (1990)
- Cazaubon S, Parker PJ, Strosberg A D, Couraud P O. Endothelins stimulate tyrosine phosphorylation and activity of p42/mitogen-activated protein kinase in astrocytes. *Biochem J* **293** : 381-386 (1993)
- Chakrabarti S, Sima A A. Endothelin-1 and endothelin-3-like immunoreactivity in the eyes of diabetic and non-diabetic BB/W rats. *Diabetes Res Clin Pract* **37** : 109-120 (1997)
- Chakrabarti S, Gan X, Merry A, Karmazyn M, Sima A. Augmented retinal endothelin-1, endothelin-3, endothelin A and endothelin B gene expression in chronic diabetes. *Curr Eye Res* **17** : 301-307 (1998)
- Chakravarthy U, Gardiner T, Anderson P, Archer D, Trimble E. The effect of endothelin 1 on the retinal microvascular pericyte. *Microvasc Res* **43** : 241-254 (1992)
- Chakravarthy U, Douglas A J, Bailie J R, McKibben B, Archer J. Immunoreactive endothelin



- distribution in ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35** : 2448-2454 (1994)
- Chakravarthy U, Hayes R, Stitt A, Douglas A. Endothelin expression in tissues of diabetic and insulin-treated rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38** : 2144-2151 (1997)
- Clermont A, Brittis M, Shiba T, McGroven T, King G, Bursell S. Normalization of retinal blood flow in diabetic rats with primary intervention using insulin pumps. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35** : 981-986 (1994)
- Clouthier D E; Hosoda K, Richardson J A, Williams S C, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer R E, Yanagisawa M. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* **125** : 813-824 (1998)
- Clozel M, Loffler B, Breu V, Hilfiger L, Maire J, Butscha B. Downregulation of endothelin receptors by autocrine production of endothelin 1. *Am J Physiol* **265** : C188-C192 (1993a)
- Clozel M, Breu V G, Burri K, Cassal J, Fischli W D, Gray G, Hirth G, Löffler B, Muller M A, Neidhart W, Ramuz H. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* **365** : 759-761 (1993b)
- Clozel M, Breu V, Gray G, Kalina B, Löffler B, Burri K, Cassal J, Hirth G, Muller M, Neidhart W, Ramuz H. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp* **270** : 228-235 (1994)
- Cody W, Doherty A. The development of potent peptide agonists and antagonists for the endothelin receptors. *Biopolymers* **37** : 89-104 (1995)
- Cogan D, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* **66** : 366-378 (1961)
- Cringle S, Yu D, Alder V, Su E. Retinal blood flow by hydrogen clearance polarography in STZ-induced diabetic rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34** : 1716-1721 (1993)

Cunha-Vaz J, Shakib M, Ashton N. Studies on the permeability, of the blood retinal barrier. I On the existence, development, and site of a blod retinal barrier. *Br J Ophthalmol* **50** : 441-453 (1966)

Cunha-Vaz J, De Abreu J, Campos A, Figo G. Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol* **59** : 649-656 (1975)

Dawson V, Dawson T, London E. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** : 6368-66371 (1991)

Davenport A P, Nunez D J, Brown M J. Binding sites for [<sup>125</sup>I]endothelin-1 in the kidney: Differential distribution in rat, pig and man. *Clin Sci (London)* **77** : 129-131 (1989)

De Juan J A, Moya F J, Garcia de la Coba M, Fernández-Cruz A, Fernández-Durango R. Identification and characterization of endothelin receptor subtype B (ET<sub>B</sub>) in rat retina. *J Neurochem* **61** : 1113-1119 (1993)

De Juan J A, Moya F J, Fernandez-Cruz A, Fernandez-Durango R. Identification of receptor subtypes in rat retina using subtype-selective ligands. *Brain Reseach* **690** : 25-33 (1995)

De la Rubia G, Oliver G, Inoguchi T, King G. Induction of resistance to endothelin 1's biochemical actions by elevated glucose levels in retinal pericytes. *Diabetes* **41** : 1533-1539 (1992)

Deng L Y, Schiffrin E L. Calcium dependence of effects of endothelin on rat mesenteric microvessels. *Can J Physiol Pharmacol* **69** : 798-804 (1991)

Deng L Y, Li J S, Schiffrin E L. Endothelin receptor subtypes in resistance arteries from humans and rats. *Cardiovasc Res* **29** : 532-535 (1995)

Deng D, Evans T, Mukherjee K, Downey D, Chakravarti S. Diabetes-induced vascular dysfunction in the retina: role of endothelins. *Diabetologia* **42** : 1228-1234 (1999)

De Nucci G, Thomas R, D'Orleans Juste P, Antunes E, Walder C, Warner T, Vane J. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelin derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** : 9797-9800 (1990)

Deussen A, Sonntag M, Vogel R. L-arginine-derived nitric oxide: a major determinant of uveal blood flow. *Exp Eye Res* **57** : 129-134 (1993)

Doherty A M. Endothelin: a new challenge. *J Med Chem* **35** : 1493-1508 (1992)

Doherty A M, Patt W C, Edmunds J J, Berryman K A, Reisdorph B R, Plummer M S, Shahripour A, Lee C, Cheng X M, Walker D M, Haleen S J, Keiser J A, Flynn M A, Welch K M, Hallack H, Taylor D G, Reynolds E E. Discovery of a novel series of orally active non peptide endothelin-A (ETA) receptor-selective antagonist. *J Med Chem* **38** : 1259-1263 (1995)

Dohi Y, Lüscher T. Aging differentially affects direct and indirect actions of endothelin-1 in perfused mesenteric arteries of the rat. *Br J Pharmacol* **100** : 889-893 (1990)

Dorfman D, Wilson D, Bruns G, Orkin S. Human transcription factor GATA 2. Evidence for regulation of preproendothelin 1 gene expression in endothelial cell. *J Biol Chem* **267** : 1279-1285 (1992)

Dvorak H, Brown L, Detmar M, Dvorak A. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* **146** : 1029-1039 (1995)

Ebihara I, Nakamura T, Tomino Y, Koide H. Effect of a specific endothelin receptor antagonist and an angiotensin-converting enzyme inhibitor on glomerular mRNA levels for extracellular matrix components, metalloproteinases (MMP) and a tissue inhibitor of MMP in aminonucleoside nephrosis. *Nephrol Dial Transplant* **12** : 1001-1006 (1997)

Eguchi S, Hirata Y, Ihara M, Yano M, Marumo F. A novel ETA antagonist (BQ123) inhibits endothelin 1 induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* **302** : 243-246 (1992)

Ehrenreich H, Kehrl J, Anderson R, Rieckmann P, Vitkovic L, Coligan J, Fauci A. A vasoactive peptide, endothelin-3 is produced by and specifically binds to primary astrocytes. *Brain Res* **538** : 54-58 (1991)

Ehrenreich H, Costa T, Clouse K, Puta R, Ogino Y, Coligan J, Burd P. Trombin is a regulator of astrocytic endothelin 1. *Brain Res* **600** : 201-207 (1993)

Endoh M, Maiese K, Pulsinelli W, Wagner J. Reactive astrocytes express NADP diaphorase in vivo after transient ischemia. *Neurosci Lett* **154** : 125-128 (1993)

Engerman R, Bloodworth J. Experimental diabetic retinopathy in dogs. *Arch Ophthalmol (Chicago)* **73** : 205-210 (1965)

Engerman R, Finkelstein D, Aguirre G, Diddie K, Fox R, Frank R, Varma S. Ocular complications. *Diabetes* **31** (Suppl 1) 82-88 (1982)

Engerman R. Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* **38** : 1203-1206 (1989)

Fawcett D W. Tratado de histología. 2ª reimpression en castellano. Ed. McGraw-Hill (1988)

Fernández-Durango R, Sanchez D, Gutkowska J, Carrier F, Fernández-Cruz A. Identification and characterization of Atrial Natriuretic Factor receptors in the rat retina. *Life Sci* **44** : 1837-1846 (1989)

Fernandez-Durango R, de Juan J A, Zimman H, Moya F J, Garcia de Lacoba M, Fernandez-Cruz A. Identification of endothelin receptor subtype (ET<sub>B</sub>) in Human cerebral cortex using subtype-selective ligands. *J Neurochem* **62** : 1482-1488 (1994)

Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung D. Molecular and biological properties of the

vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrinol Rev* **13** : 18-32 (1992)

Filep J, Sirois M, Rousseau A, Fournier A, Sirois P. Effects of endothelin-1 on vascular permeability on conscious rat : interaction with platelet activating factor. *Br J Pharmacol* **104** : 797-804 (1991)

Firth J, Ratcliffe P. Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest* **90**: 1023-1031 (1992)

Frank H, Levin E, Hu R, Pedram A. Insulin stimulates endothelin binding and action on cultured vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **133** : 1092-1097 (1993)

Franke R, Konig B, Sakmar T, Khorana H, Hofman K. Rhodopsin mutants that bind but fail to activate transduction. *Science* **250** : 123-125 (1990)

Frelin C, Ladoux A, Marsault R, Vigne P. Functional properties of high and low affinity receptor subtypes for endothelin 3. *J Cardiovas Pharmacol* **17** (supple 7) : S131-S133 (1991)

Frelin C, Ladoux A, Marsault R, Vigne P. Function of vasoactive factors in the cerebral microcirculation. *J Cardiovas Pharmacol* **20** : S94-S96 (1992)

Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Osada S, Tomino Y, Masaki T, Goto K, Furuichi Y, Koide H. Gene expression for endothelins and their receptors in glomeruli of diabetic rats. *J Lab Clin Med* **122** : 149-156 (1993)

Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **199** : 1461-1465 (1994)

Fulton D, Hodgson W, Sikorski B, King R. Attenuated responses to endothelin 1, KCl, and CaCl, but not noradrenaline, of aortae from rats with streptozocin induced diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* **104** : 928-932 (1991)

Gardner J, Maher E, Avitv A. Calcium mobilization and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport activation by endothelin in human skin fibroblast. *FEBS Lett* **256** : 38-42 (1989)

Giaid A, Gibson S J, Ibrahim N B, Legon S, Bloom S R, Yanagisawa M, Masaki T, Varndell I M, Polak J M. Endothelin-1, an endothelium derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 7634-7638 (1989)

Giorgi O, Pibiri M G, Dal Toso R, Ragatzu G. Age-related changes in the turnover rates of D1-Dopamine receptors in the retina and in distinct areas of the rat brain. *Brain Res* **569** : 323-329 (1992)

Glaser B, D'Amore P, Michels R. Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. *J Cell Biol* **84** : 298-304 (1980)

Goetz K, Wang B, Madwed J, Zhu J, Leadley R. Cardiovascular, renal, and endocrine responses to intravenous endothelin in concious dogs. *Am J Physiol* **225** : F1051-F1058 (1988)

Gospodarowicz D. Fibroblast growth factors: From genes to clinical applications. *Cell Biol Rev* **25** : 307-314 (1991)

Grant M, Rusell B, Fitzgerald C, and Merimee T. Insulin like growth factor in the vitreous. *Diabetes* **35** : 416-420 (1986)

Grant M, Mames R, Fitzgerald C. Insulin like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: Comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* **36** : 282-291 (1993)

Gu X, Ou R, Casley D, Daly M, and Nayler W. Effect of age on endothelin-1 binding sites in rat cardiac ventricular membranes. *J Cardiovas Pharmacol* **19**: 764-769 (1992)

Guidry C, Hook M. Endothelins produced by endothelial cells promotes collagen gel contraction by fibroblasts. *J Cell Biol* **115** : 873-880 (1991)

- Guyton A C. Tratado de fisiología médica. Madrid; Ed. Interamericana-McGraw-Hill pag. 239-240 (1989)
- Gutkowska J. Radioimmunoassay for atrial natriuretic factor. Nucl Med Biol **14** : 323-321 (1987)
- Gulberg V, Gerbes A, Vollmar A, Paumgartner G. Endothelin-e like immunorectivity in plasma of patioens with cirrhosis of the liver. Life Sci **51** : 1651-1659 (1992)
- Haak T, Jungmann E, Felber A, Hillmann U, Usadel K. Increased plasma levels of endothelin in diabetic patiens with hypertension. Am J Hypertens **5** : 161-166 (1992)
- Hama H, Sakurai T, Kasuya Y, Fujiki M, Masaki T, Goto K. Action of endothelin-1 on rat astrocytes through the ETB receptor. Biochem Biophys Res Commun **186** : 355-362 (1992)
- Hammes H, Lin J, Bretzel R, Brownlee M, Breier G. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/ Vascular endotelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. Diabetes **47** : 401-406 (1998)
- Harland S P, Kuc R E, Pickard J D, Davenport A P. Expression of endothelin A receptors in human gliomas and meningiomas, with high affinity for the selective antagonist PD156707. Neurosurgery **43** : 890-899 (1998)
- Hattori Y, Kasaj K, Nakamura T, Emoto T, Shimoda S. Effect of glucose and insulin on immunoractive endothelin I release from cultured porcine aortic endothelial cells. Metabolism **40** : 165-169 (1991)
- Herkenham M, Pert C. Light microscopic localization of brain opiate receptors: A general autoradiographic method which preserves tissue quality. J Neurosc **2** : 1129-1149 (1982)
- Hickey K, Rubanyi G, Paul R, Highsmith R. Characterización of a coronary vasoconstrictor



produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* **248** : C550-C556 (1985)

Hildebrand P, Mrozinski J, Mantey S, Patto R, Jensen R. Pancreatic acini possess endothelin receptors whose internalization is regulated by PLC activating agents. *Am J Physiol* **264** : G984-G993 (1993)

Hirata Y, Yoshimi H, Takaichi S, Yanagisawa M, Masaki T. Binding and receptor down regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* **239** : 13-17 (1988)

Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **78** : 225-228 (1989)

Hirata Y, Matsunaga T, Ando K, Furukawa T, Tsukagoshi H, Marumo S. Presence of endothelin-1-like-immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun* **166** : 1274-1278 (1990)

Holden W, McCall E. Hypoxic vasoconstriction of porcine pulmonary artery strips in vitro requires an intact endothelium. *Am Rev Resp Dis* **127** : 301 (1983)

Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin A receptor. *J Biol Chem* **267** : 18797-18804 (1992)

Hosoda K, Hammer R, Richardson J, Baynash A, Cheung J, Giaid A, Yanagisawa M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megalocolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* **79** : 1267-1276 (1994)

Hu R, Levin E, Pedram A, Frank H. Insulin stimulates production and secretion of endothelin from bovine endothelial cells. *Diabetes* **42** : 351-358 (1993)

Huang Z, Huang P, Panahian N, Dalkara T, Fishman M, Moskowitz M. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* : **265** : 1883-1885 (1994)

Huang Z, Huang P, Fishman M, Moskowitz M. Focal cerebral ischemia in mice deficient either endothelial (eNOS) or neuronal nitric oxide (nNOS) synthase. *Stroke* **27** : 173 (1996)  
Abstract

Inishi Y, Okuda T, Arakawa T, Kurokawa K. Insulin attenuates intracellular calcium responses and cell contraction caused by vasoactive agents. *Kidney Int* **45** : 1318-1325 (1994)

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptide predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 2863-2867 (1989)

Ishibashi T, Tanaka K, Taniguchi Y. Disruption of blood-retinal barrier in experimental diabetic rats: an electron microscopic study. *Exp Eye Res* **30** : 401-410 (1979)

Ishibashi M, Haizuka H, Tsukamura T, Furue H, Yamaji T, Ladoux A, Frelin C. Endothelin 1 and blood pressure: endothelins inhibit adenylate cyclase in brain capillary endothelial cells. *Am J Hypertens* **5** : 772-774 (1992)

Ishii H, Jirousek M, Koya D, Takagi C, Kia P, Clermont A, Bursell S, Kern T, Ballas L, Heath W, Stramm L, Feener E, King G. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC  $\beta$  inhibitor. *Science* **272** : 728-731 (1996)

Ishikawa T, Li L, Shinmi O, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Characteristics of binding of endothelin-1 and endothelin-3 to rat hearts. *Circulation Res* **69** : 918-926 (1991)

Itoh Y, Yanagisawa M, Ohkubo S, Kimura C, Kosaka T, Inoue A, Ishida N, Mitsui Y, Onda H, Fujino M. 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* **231** : 440-444 (1988)

Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirate Y. Endothelin-mediated vascular growth

requires p42/p44 mitogen activated protein kinase and p70S6 kinase cascades via transactivation of EGF receptor. *Endocrinol* **140** : 4659-4668 (1999)

James C, Cotlier E. Fate of insulin in the retina: an autoradiographic study. *Br J Ophthalmol* **67** : 80-88 (1983)

Janakidevi K, Fuisher M, Del Vecchio P, Tirappathi C, Figge J, Malik A. Endothelin 1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* **263** : C1295-C1301 (1992)

Jones C R, Hiley C P, Pelton J T, Miller R C. Endothelin receptor heterogeneity; structure activity, autoradiographic and functional studies *J Recept Res* **11** : 299-310 (1991)

Kaneko M, Carper D, Nishimura C, Millen J, Bock M, Honman T. Induction of aldose reductase expression in rat kidney mesangial cells and chinese hamster ovary cells under hypertonic conditions. *Exp Cell Res* **188** : 135-140 (1990)

Kar S, Quirion R. Neuropeptide receptors in developing and adult rat spinal cord: an in vitro quantitative autoradiography study of calcitonin gene-related peptide, neurokinins, mu-opioid, galanin, somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *J Comp Neurol* **354** : 253-281 (1995)

Karne S, Jayawickreme Ch, Lerner M. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC) from *Xenopus laevis* renal melanophores. *J Biol Chem* **25** : 19126-19133 (1993)

Katwa L, Guarda E, Weber K. Endothelin receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. *Cardiovas Res* **27** : 2125-2129 (1993)

Kawamura M, Ohgawara H, Naruse M, Suzuki N, Jwasaki N, Naruse K, Hori S, Demura H, Homori Y. Increased plasma endothelin in NIDDM patients with retinopathy. *Diabetes care* **15** : 1396-1397 (1992)

Keck P, Hauser S, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly D. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246** : 1309-1312 (1989)

Kihara M, Low P A. Impaired vasoreactivity to nitric oxide in experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol* **132** : 180-185 (1995)

Kimura C, Itoh Y, Ohkubo S, Ogi K, Onda H, Fujino M. Cloning and sequencing of a canine gene segment encoding mature endothelin. *Nucleic Acid Res* **17** : 3290 (1989)

King A, Brenner B, Anderson S. Endothelin: A potent renal and systemic vasoconstrictor peptide. *Am J Physiol* **256** : F1051-F1058 (1989)

Kloog Y, Sokolovsky M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol Sci* **10** : 212-214 (1989a)

Kloog Y, Bousso-Mittler D, Bdolah A, Sokolovsky M. Three apparent receptor subtypes for the endothelin/sarafotoxin family. *FEBS Lett* **253** : 199-202 (1989b)

Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yushizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* **238** : 249-252 (1998)

Koseki C, Imaizumi M, Hirata Y, Yanagisawa M, Masaki T. Autoradiographic localization of <sup>125</sup>I-ET-1 binding sites in rat brain. *Neurosci Res* **6** : 581-585 (1989)

Koya D, King G. Protein Kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* **47** : 859-866 (1998)

Kozuka M, Ito T, Hirose S, Lodhi K M, Hagiwara H. Purification and characterization of bovine lung endothelin receptor *J Biol Chem* **226** : 16892-16896 (1991)

Kuhar M. Receptor localization with the microscope in: *Neurotransmitter Receptor Binding*. Breston M. (Ed.). Raven Press (1985)

- Kuo P, Schroeder R. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg* **221** : 220-235 (1995)
- Kurihara T, Akimoto M, Kurokawa K, Ishiguro H, Niimi A, Maeda A, Sigemoto Yamashita K, Yokoyama I, Hirayama I. Relationship between endothelin and thromboxane A2 in rat liver microcirculation. *Life Sci* **51** : 281-285 (1992)
- Kurihara Y , Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* **368** : 703-710 (1994)
- Ladenheim R, Lacroix I, Foignant-Chaverot N, Strosberg A, Couraud P. Endothelins stimulate *c-fos* and nerve growth factor expression in astrocytes and astrocytoma. *J Neurochem* **60** : 260-266 (1993)
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-684 (1970)
- Lansen N, Niemeyer G. Effects of insulin under normal and low glucose on retinal electrophysiology in the perfused cat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38** : 792-799 (1997)
- Lee M E, Monte S M, Ng S C, Bloch K D, Quertermous T. Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest* **86** : 141-147 (1990)
- Lee M, Dhadly M, Temizer D, Clifford J, Yoshizumi M, Quertermous T. Regulation of endothelin 1 gene expression by Fos and Jun. *J Biol Chem* **266** : 19034-19039 (1991)
- Lepple-Wienhues A, Becker M, Stahl F, Berwek S, Hensen J, Noske W, Eichhorn M, Wiederholt M. Endothelin-like immunoreactivity in the aqueous humor and in conditioned medium from cultured ciliary epithelial cells. *Curr Eye Res* **11** : 1041-1046 (1992)

L'Esperance F A, James W A. The eye and the diabetes Mellitus. En Diabetes Mellitus (3ª Ed.). Ellenberg M, y Rifkin H (De.). Medical Examination Publiding Co. Inc. New York (1983)

Leuenberger P, Cameron D, Stauffacher W, Renold A, Babel J. Ocular lesion in rats rendered chronically diabetic with streptozotocin. *Ophthalmol Res* **2** : 189-204 (1971)

Lonchamp M, Pinelis S, Goulin J, Chabrier P, Braquet P. Proliferation and Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> exchange activation by endothelin in in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* **4** : 776-779 (1991)

Lorenzi M, Cagliero E. Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus. *Diabetes* **40** : 653-659 (1991)

Lou H, Edvinsson L, MacKenzie E. The concept of coupling blood flow to brain function: revision required? *Ann Neurol* **22** : 289-297 (1987)

Lovenberg W, Miller R. Endothelin: a review of its effects and possible mechanisms of action. *Neurochem Res* **15** : 407-417 (1990)

Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193** : 265-275 (1951)

Lumbaek K, Christensen N, Jensen N. Diabetes, diabetes angiopathy and growth hormone. *Lancet* **2** : 131-133 (1970)

Masaki T, Vane J, Vanhoutte P. International union of pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol Rev* **46** : 137-142 (1994)

Massagué J, Czech M. Affinity Cross-Linking of receptors fon insulin and the insulin-like growth factors I and II. *Methods in Enzymology* **109** : 179-187 (1985)

Matsuura A, Kavashima S, Yamochi W, Hirata K, Yamaguchi T, Fumoto N, Yokoyama M.

Vascular endothelial growth factor increases endothelin-converting enzyme expression in vascular endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun* **235** : 713-716 (1997)

McCumber M W, Ross C A, Glasser B M, Snyder S H. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 7285-7289 (1989)

McCumber M, Ross A, Snyder S. Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87** : 2359-2363 (1990)

McCumber M W, Jampel H D, Snyder S H. Ocular effect of endothelin. *Arch Ophthalmol* **109** : 705-709 (1991)

McCumber M W, D'Anna S A. Endothelin receptor-binding subtypes in the human retina and choroid. *Arch Ophthalmol* **112** : 1231-1235 (1994)

McDonald D, Bailie J, Archer D, Chakravarthy U. Molecular characterization of endothelin receptors and effect of insulin on their expression in retinal microvascular pricytes. *J Cardiovas Pharmacol* **26 (Supple. 3)** : S287-S289 (1995)

McMurdo L, Corder R, Thiemermann C, Vane J R. Incomplete inhibition of the pressor effects of endothelin-1 and related peptides in the anaesthetized rat with BQ123 provides evidence for more than one vasoconstrictor receptor. *Br J Pharmacol* **108** : 557-561 (1993)

Meyer P, Flammer J, Luscher T. Endothelium-dependent regulation of the ophthalmic microcirculation in the perfused porcine eye. *Inves Ophthalmol Vis Sci* **34** : 3614-3621 (1993)

Michaelson I. The mode of development of the vascular system in the retina: With some observations on its significance for certain retinal diseases. *Trans Ophthalmol Soc UK* **68** : 137-180 (1948)

Millan M, Aguilera G, Wynn P, Mendelsohn F, Catt K. Autoradiographic localization of brain receptors for peptide hormones: Angiotensin II, corticotropin-releasing factor, and gonadotropin-releasing hormone. *Methods in Enzymology* **124** : 590-606 (1986)

Miller W, Redfield M, Burnett J. Integrated cardiac, renal, and endocrine action of endothelin. *J Clin Invest* **83** : 317-320 (1989)

Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* **47** : 445-449 (1998)

Nakajo S, Sugiura M, Inagami T, Nitta K, Naruse M, Sanaka T, Tsuchiya K, Naruse K, Zeng P, Demura H, Sugino N. Native form of endothelin receptor in human placental membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **167** : 280-286 (1990)

Nakamura M, Tabuchi Y, Rakugi H, Nagano M, Ogihara T. Actions of endothelin on adrenergic neuroeffector junction. *J Hypertens* **7** : S132-S133 (1989)

Nakamura T, Ebihara I, Fukui M, Tomino Y, Koide H. Effect of a specific endothelin receptor A antagonist on mRNA levels for extracellular matrix components and growth factors in diabetic glomeruli. *Diabetes* **44** : 895-899 (1995)

Nakamura T, Ebihara I, Tomino Y, Koide H. Alteration of growth related proto-oncogene expression in diabetic glomeruli by a specific endothelin receptor A antagonist. *Nephrol Dial Transplant* **11** : 1158-1231 (1996)

Namiki A, Hirata Y, Ishikawa M, Moroi M, Aikawa I, Machii K. Endothelin-1 endothelin-3-induced vasorelaxation via common generation of endothelium-derived nitric oxide. *Life Sci* **50** : 677-682 (1992)

Naylor W, Liu J, Panagiotopoulos S, Casley D. Streptozotocin-induced diabetes reduces the density of <sup>125</sup>I-ET-1-binding sites in rat cardiac membranes. *Br J Pharmacol* **97** : 993-995 (1989)



- Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* **19** : 307-312 (1996)
- Nilsson T, Cantera L, Adner M, Edvinsson L. Presence of contractile endothelin-A and dilatory endothelin-B receptors in human cerebral arteries. *Neurosurgery* **40** : 346-353 (1997)
- Nunez D J, Brown M J, Davenport A P, Neylon C B, Schofield J P, Wyse R K. Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. *J Clin Invest* **85** : 1537-1541 (1990)
- Nyengaard J, Chang K, Berhorst S, Reiser K M, Williamson J R, Tilton R G. Decreased expression of collagenase-soluble collagen in diabetic rat glomerulus. *Diabetes* **46** : 94-106 (1997)
- Ohira A, Stefansson E E, De Juan E, Davidson R C, Faberowski N. Retinal ischemia and cell proliferation in the rat. The role of soluble mitogens. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* **228** : 195-199 (1990)
- Ohnaka K, Takayanagi R, Yamauchi T, Okazaki H, Ohashi M, Umada F, Nawata H. Identification and characterization of endothelin converting activity in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **168** : 1128-1136 (1990)
- Oliver F, De la Rubia G, Feener E, Lee M, Loeken M, Shiba T, Quertermous T, King G. Stimulation of endothelin 1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* **266** : 23251-23256 (1991)
- O'Steen W K, Brodish A. Scleral calcification and photoreceptor cell death during aging and exposure to chronic stress. *Am J Anat* **189** : 62-68 (1990)
- Pardridge W, Eisenberg J, Yang J. Human blood brain barrier insulin receptor. *J Neurochem* **121** : 1771-1778 (1985)
- Parker-Botelho L, Cade C, Phillips P, Rubanyi G. Tissue specificity of endothelin synthesis and binding. 122-123. In *Endothelins*. Painter R. (Ed.) Oxford Univ. Press. New York NY.

(1993)

Patiño R, Ibarra J, Molino A, Fernández-Durango R, Moya J, Fernandez Cruz A. Increased plasma endothelin in diabetes: an atherosclerosis marker? *Diabetologia* **37** : 333-334 (1994)

Pedram A, Rozandi M, Hu H, Levin E. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* **272** : 17097-17103 (1997)

Peréz M T, Larsson B, Alm P, Andersson K E, Ehinger B. Localisation of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactivity in rat and rabbit retinas. *Exp Brain Res* **104** : 207-217 (1995)

Predel H, Meyer M, Lehnert H, Backer A, Stelkens H, Kramer H. Plasma concentration in patients with abnormal vascular reactivity. Effects of ergometric exercise and acute saline loading. *Life Sci* : **47** 1837-1842 (1990)

Rakieten N, Rakieten M, Nadkarni M. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917) *Cancer Chemother Rep* **29**: 91-98 (1963)

Ramachandran E, Frank R, Kennedy A. Effects of endothelin on culture ovine retinal microvascular pericytes. *Inves Ophthalmol Vis Sci* **34** : 586-595 (1993)

Reichenbach A, Schnitzer J, Friedrich A, Henke A. Development of the rabbit retina: II. Mullers cells. *J Comp Neurol* **311** : 33-44 (1991)

Reiser G, Donié F. Endothelin induces a rise of inositol 1,4,5-trisphosphate, inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate levels and cytosolic  $Ca^{2+}$  activity in neural cell lines. *Eur J Neurosci* **2** : 769-775 (1990)

Resink T, Scott-Burden T, Buhler F. Phorbol ester promotes a sustained down regulation of endothelin receptors and cellular responses to endothelin in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **166** : 1213-1219 (1990)

Reygrobellet D, Baudouin C, Negre F. Acidic FGF and others growth factors in preretinal membranes from patients diabetic retinopathy and vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* **23** : 154-161 (1991)

Reynaud X, Dorey C. Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35** : 3169-3177 (1994)

Reynolds E, Mok L, Kurokawa S. Phorbol ester dissociates stimulated phosphoinositide hydrolysis and arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **160** : 868-873 (1989)

Ripodas A, De Juan J, Moya J, Fernandez-Cruz A, Fernandez-Durango R. Identification of endothelin receptor subtypes in rat ciliary body using subtype-selective ligands. *Exp Eye Res* **66** : 69-79 (1998)

Robison W, Jacot J, Glover J, Basso M, Hohman T. Diabetic-like retinopathy ; early and late intervention therapies in galactose-fed rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39** : 1933-1941 (1998)

Roufail E, Soulis T, Boel E, Cooper M E, Rees S. Depletion of nitric oxide synthase-containing neurons in the diabetic retina: reversal by aminoguanidine. *Diabetologia* **41** : 1419-1425 (1998)

Rubanyi G, Polokoff M. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, Pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol Rev* **46** : 325-415 (1994)

Saida K, Mitsui Y, Ishida N. A novel peptide, vasoactive intestinal constrictor, of a new (endothelin) peptide family. *J Biol Chem* **264** : 14613-14616 (1989)

Saito M, Nishi K, Foster H, Weiss R, Latifpour J. Effect of experimental diabetes on rat prostate endothelin receptors. *Eur J Pharmacol* **310** : 197-200 (1996a)

Saito M, Nishi K, Fukumoto Y, Weiss R, Latifpour J. Characterization of endothelin receptors

in streptozotocin-induced diabetic rat vas deferens. *Biochem Pharmacol* **52** : 1593-1598 (1996b)

Saito Y, Nakao K, Itoh H, Yamada T, Mokoyama M, Arai H, Hosoda K, Shirakami G, Suga S, Jougasaki G, Morichika S, Imura H. Endothelin in human plasma and culture medium of aortic endothelial cells: detection and characterization with radioimmunoassay using monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun* **163** : 320-326 (1989a)

Saito Y, Nakao K, Shirakami G, Jougasaki G, Yamada T, Itoh H, Mokoyama M, Arai H, Hosoda K, Suga S, Morichika S, Imura H. Detection and characterization of endothelin 1 like immunoreactivity in rat plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **163** : 1512-1516 (1989b)

Saito Y, Mizuno Itakura M, Suzuki Y, Ito T, Hagiwara H, Hirose S. Primary structure of bovine endothelin ETB receptor and identification of signal peptidase and metal proteinase cleavage sites. *J Biol Chem* **266** : 23433-23437 (1991)

Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Himura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non isopeptide selective subtype of endothelin receptor. *Nature* **348** : 732-735 (1990)

Sakurai T, Yanagisawa M, Inoue A, Ryan U, Kimura S, Mitsui Y, Mitsui Y, Goto K, Masaki T. cDNA cloning, sequence analysis, and tissue distribution of rat endothelin 1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **175** : 44-47 (1991)

Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptor. *Trends Pharmacol Sci* **13** : 103-108 (1992)

Sakurai-Yamashita Y, Yamashita K, Kataoka Y, Himeno K, Niwa M, Taniyama K. Expression of endothelin receptors and nitric oxide synthase in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rats with cerebral apoplexy. *Brain Res* **756** : 61-67 (1997)

Samson W, Skala K, Alexander B, Huang F. Pituitary site of action of endothelin: selective inhibition of prolactin release in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **168** : 737-743 (1990)

- Samson W, Skala K, Alexander B, Huang F. Possible neuroendocrine actions of endothelin-3. *Endocrinology* **128** : 1465-1473 (1991)
- Sawamura T, Kimura S, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Purification and characterization of putative endothelin converting enzyme in bovine adrenal medulla: evidence for a cathepsin D like enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **168** : 1230-1236 (1990)
- Sasaki Y, Takimoto M, Oda K, Früh T, Takai M, Okada T, Hori S. Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes. *J Neurochem* **68** : 2194-2200 (1997)
- Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* **51** : 660-672 (1949)
- Schnitzer J. Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol* **282** : 449-263 (1989)
- Schwartz I, Ittoop O, Hazum E. Identification of endothelin receptors by chemical cross-linking. *Endocrinology* **126** : 829-833 (1990)
- Schwartz I, Ittoop O, Hazum E. Identification of a single binding protein for endothelin-1 and endothelin-3 in bovine cerebellum membranes. *Endocrinology* **128** : 126-130 (1991)
- Shichiri M, Hirata Y, Kanno K, Ohta K, Emori T, Marumo F. Effect of endothelin-1 on release of arginine-vasopressin from perfused rat hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* **163** : 1332-1337 (1989)
- Shichiri M, Hirata Y, Ando K. Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension* **15** : 493-496 (1990)
- Shichiri M, Sedivy J M, Marumo F, Hirata Y. Endothelin-1 is a potent survival factor for c-Myc dependent apoptosis. *Mol Endocrinol* **12** : 172-180 (1998)

Shin S, Lee Y, Lin S, Tan M, Lai Y, Tsai J. Decrease of renal endothelin 1 content and gene expression in diabetic rats with moderate hyperglycemia. *Nephron* **70** : 486-493 (1995)

Simonson M, Dunn M. Endothelin 1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates beta adrenergic mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *J Clin Invest* **85** : 790-797 (1990)

Simonson M, Dunn M. Endothelins: a family of regulatory peptides. *Hypertension* **17** : 856-863 (1991)

Simonson M, Jones J J, Dunn M. Differential regulation of *fos* gene expression and AP-1 cis-element activity by endothelin isopeptides. *J Biol Chem* **267** : 8643-8649 (1992)

Siren A, Feuerstein G E. Hemodynamic effects of endothelin after systemic and central nervous system administration in the conscious rat. *Neuropeptides* **14** : 231-236 (1989)

Sirvio M L, Metsarinne K, Saijonmaa O, Fyhrquist F. Tissue distribution and half life of <sup>125</sup>I-endothelin in the rat : importance of pulmonary clearance. *Biochem Biophys Res Commun* **167** : 1191-1195 (1990)

Sitt T, Chakravarthy U, Gardiner T A, Archer D B. Endothelin-like immunoreactivity and receptor binding in the choroid and retina. *Curr Eye Res* **15** : 111-117 (1996)

Sokolovsky M. Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Pharmacol Ther* **54** : 129-149 (1992)

Sosula L, Beaumont P, Hollows F, Jonson K. Dilatation and endothelial proliferation of retinal capillaries in streptozotocin-diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **11** : 926-935 (1972)

Stojilkovic S, Merelli L, Lida T, Krsmanovic L, Calt K. Endothelin stimulation of cytosolic

calcium and gonadotropin secretion in anterior pituitary cells. *Science* **248** : 1663-1666 (1990)

Stone J, Chan-Ling T, Pe'er J, Itin A, Gnessin H, Keshet E. Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. *Inves Ophthalmol Vis Sci* **37** : 290-299 (1996)

Sullivan M E, Dashwood M R, Thompson C S, Muddle J R, Mikhailidis DP, Morgan R J. Alterations in endothelin B receptor sites in cavernosal tissue of diabetic rabbits: potential relevance to the pathogenesis of erectile dysfunction. *J Urol* **158** : 1966-1972 (1997)

Takagi C, Bursell S, Lin Y, Takagi H, Duh E, Jiang Z, Clermont A, King G. Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1. *Inves Ophthalmol Vis Sci* **37** : 2504-2518 (1996)

Takahashi K, Brooks R A, Kanse S M, Ghatei M A, Khoner E M, Bloom S R. Production of endothelin-1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors on associated pericytes. *Diabetes* **38** : 1200-1202 (1989)

Takahashi K, Ghatei M, Lam H C, O'Halloran D J, Bloom S R. Elevated plasma endothelins in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* **33** : 306-310 (1990)

Takahashi K, Ghatei M A, Jones P M, Murphy J K, Lam H C, O'Halloran D J, Bloom S R. Endothelin in human brain and pituitary gland: presence of immunoreactive endothelin, endothelin messenger ribonucleic acid, endothelin receptors. *J Clin Endocrinol Metab* **72**: 693-699 (1991a)

Takahashi K, Suda K, Lam H, Ghatei M, Bloom S. Endothelin like immunoreactivity in rat models of diabetes mellitus. *J Endocrinol* **130** : 123-127 (1991b)

Takaori K, Inoue K, Kogire H, Higashide S, Tun T, Aung T, Dol R, Fugii N, Tobe T. Effects of endothelin on microcirculation of the pancreas. *Life Sci* **51** : 615-622 (1992)

Takeda Y, Miryamori I, Yoneda T, Takeda R. Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* **48** : 2553-2555 (1991)

Takei K, Sato T, Nonoyama T, Hommura S, Miyauchi T, Goto K. Analysis of vasocontractile responses to endothelin-1 in rabbit retinal vessels using an ETA receptor antagonist and an ETB receptor agonist *Life Sci* **53** : 111-115 (1993)

Taniguchi T, Okada K, Haque M S, Sugiyama K, Kitazawa Y. Effects of Endothelin-1 on intraocular pressure and aqueous humor, dynamics in the rabbit eye. *Curr Eye Res* **13** : 461-464 (1994)

Thieme H, Aiello L, Takagi H, Ferrara N, King G. Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells. *Diabetes* **44** : 98-103 (1995)

Toke B. Immunohistochemical characterization of retinal glial cell changes in areas of vascular occlusion secondary to diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol Scand* **75** : 388-292 (1997)

Tseng Y, Lahiri S, Jackson S, Burman K, Watofsky L. Endothelin binding to receptors and endothelin production by human thyroid follicular cells: effects of TGF $\beta$  and thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab* **76** : 156-161 (1993)

Valentin J, Gardner D, Wiedemann E, Humphreys M. Modulation of endothelin effects on blood pressure and hematocrit by atrial natriuretic peptide. *Hypertension* **17** : 864-869 (1992)

Valverde I, Barreto M, Malaisse W. Stimulation by D-glucose of protein biosynthesis in tumoral insulin-producing cells (RINm5F line). *Endocrinology* **122** : 1443-1448 (1988)

Vanderwinder J, Mailleux P, Schiffmann S. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N Engl J Med* **327** : 511-515 (1992)



Vig P, Desai D, Subramony S, Fratkin J. Developmental changes in cerebellar endothelin-1 receptors in the neurologic mouse Lurcher mutant. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **89** : 307-316 (1995)

Vigne P, Ladoux A, Frelin C. Endothelins activate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in brain capillary endothelial cells via a high affinity endothelin 3 receptor that is not coupled to phospholipase C. *J Biol Chem* **266** : 5925-5926 (1991)

Vorwerk C K, Hyman B T, Miller J W, Husain D, Zurakowski D, Huang P L, Fishman M C, Dreyer E B. The role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in retinal excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38** : 2038-2044 (1997)

Waggoner W G, Genova S L, Rash V A. Kinetic analyses demonstrate that the equilibrium assumption does not apply to  $^{125}\text{I}$ -endothelin-1 binding. *Life sci* **51** : 1869-1876 (1992)

Waltman S, Krupin T, Hanish S, Oestrich C, Becker B. Alteration of the blood retinal barrier in experimental diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* **96** : 878-879 (1978)

Warner T, Shmidt H, Murad F. Interaction of endothelins and EDRF in bovine native endothelial cells: selective effects of endothelin 3. *Am J Physiol* **262** : H1600-H1605 (1992)

Webb M L, Chao C C, Rizzo M, Shapiro R A, Neubauer M, Liu E C, Aversa C R, Brittain R J, Treiger B. Cloning and expression of an endothelin receptor subtype B from human prostate that mediates contraction. *Mol Pharmacol* **47** : 730-737 (1995)

Weisse I, Loosen H, Peil H. Age-related retinal changes-comparison between albino and pigmented rats. *Lens eye Toxic Res* **7** : 717-719 (1990)

Weale R A. Do years or quanta age the retina? *Photochem Photobiol* **50** : 429-438 (1989)

- Wheater P, Burkitt H, Daniels V. *Histología Funcional*. 2ª Edición Ed. JIMS (1987)
- Wiklund N, Wiklund C, Ohlen A, Gustafsson L. Cholinergic neuromodulation by endothelin in guinea pig ileum. *Neurosci Lett* **101** : 342-346 (1989)
- Williams D L, Jones K L, Pettibon D J, Lis E V, Clineschmid BV Sarafotoxin S6C: an agonist which distinguishes between receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Comm* **175** : 556-561 (1991)
- Williamson J, Chang K, Frangos M, Hasan K, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard J, Van Den Enden M, Kilo C, Tilton R. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* **42** : 801-883 (1993)
- Winegrad A. Does a common mechanism induce the diverse complications of the diabetes? *Diabetes* **36** : 396-406 (1986)
- Wollensak G, Schaefer H E, Ihling Ch. An immunohistochemical study of endothelin-1 in the human eye. *Curr Eye Res* **17** : 541-545 (1998)
- Yamagishi S, Hsu C, Kobayashi K, Yamamoto H. Endothelin 1 mediates endothelial cell dependent proliferation of vascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* **191** : 840-846 (1993)
- Yamanuchi T, Ohnaka K, Takayanagi R, Umeda F, Nawata H. Enhanced secretion of endothelin 1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* **267** : 16-18 (1990)
- Yamashita K, Niwa M, Kataoka Y, Shigematsu K, Himeno A, Tsutsumi K, Nakashima M N, Yamashita Y S, Shibata S, Taniyama K. Microglia with an endothelin ETB receptor aggregate in rat hippocampus CA1 subfields following transient forebrain ischemia. *J Neurochem* **63** : 1042-1051 (1994)
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto

K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by endothelial cells. *Nature (Lond.)* **332** : 411-415 (1988a)

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 USA* **85** : 6964-6967 (1988b)

Yorimitsu K, Moroi K, Inagaki N. Cloning and sequencing of a human endothelin converting enzyme in renal adenocarcinoma (ACNH) cells producing endothelin-2. *Biochem Biophys Res Commun* **208** : 721-727 (1995)

Yoshizawa T, Kimura S, Kanazawa I, Uchiyama Y, Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin localizes in the dorsal horn and acts on the spinal neurons: possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. *Neurosci Lett* **102** : 179-184 (1989)

Zahniser N, Goens M, Hanaway P, Vinych J. Characterization and regulation of insulin receptors in rat brain. *J Neurochem* **42** : 1354-1362 (1984)

Zetterstrom C, Benjamin A, Rosenzweig S. Differential expression of retinal insulin receptors in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes* **41** : 818-824 (1992)

Zhang Z, Chopp M, Zaloga C, Pollock J, Forstermann U. Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after local cerebral ischemia in rats. *Stroke* **24** : 2016-2022 (1993)

Zimmermann M F, Seifert V K. Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview. *Neurosurg* **43** : 863-876 (1998)

## **8. ABREVIATURAS**

## 8. ABREVIATURAS

<b>aa</b>	aminoácido
<b>AGII</b>	Angiotensina II
<b>Big-ET-1</b>	Proendotelina-1
<b>Bmax</b>	Densidad de receptores
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CCG</b>	Capa de células ganglionares
<b>CCB</b>	Capa de conos y bastones
<b>CNE</b>	Capa de núcleos externa
<b>CNI</b>	Capa de núcleos interna
<b>CO</b>	Coroides
<b>DAB</b>	3,3' diaminobencidina
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DSS</b>	Disuccinimidil suberato
<b>E</b>	Esclerótica
<b>ECE</b>	Enzima convertidora de endotelina
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>ET-1, -2, -3</b>	Endotelina-1, -2, -3
<b>ETA</b>	Receptor de endotelina tipo A
<b>ETB</b>	Receptor de endotelina tipo B
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>GC</b>	Grupo de ratas controles
<b>GD</b>	Grupo de ratas diabéticas
<b>GT</b>	Grupo de ratas diabéticas tratadas con insulina
<b>IP3</b>	Inositoltrisfosfato
<b>IR</b>	Inmunorreactivo
<b>Kd</b>	Constante de disociación
<b>MMP I</b>	Metaloendopeptidasa de membrana I
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PAF</b>	Factor activante de plaquetas
<b>PAN</b>	Péptido Atrial Natriurético
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E2
<b>PIO</b>	Presión intraocular
<b>PKC</b>	Proteína kinasa C
<b>PLA</b>	Fosfolipasa A
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLD</b>	Fosfolipasa D
<b>PLL</b>	Poli-L-Lisina
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonilfluoruro
<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis
<b>S6c</b>	Sarafotoxina 6 c
<b>SDS</b>	Sodio dodecilsulfato
<b>SEM</b>	Error estandar de la Media

<b>STZ</b>	Streptozotocina
<b>TGFB</b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular

**9. ÍNDICE**

## 9. ÍNDICE

	<u>Páginas</u>
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La familia de las endotelinas.....	3
1.1.1 Estructura de las endotelinas.	
1.1.2 Estructura, expresión y regulación de los genes de las endotelinas.	
1.1.3 Biosíntesis de las endotelinas.	
1.1.4 Presencia de las endotelinas en los fluidos corporales.	
1.2. Receptores de membrana de las endotelinas.....	8
1.2.1 Caracterización de los receptores de las endotelinas. Agonistas y antagonistas específicos.	
1.2.2 Clonación de los ADNc de los receptores de las endotelinas.	
1.2.3 Estructura de los receptores de endotelina.	
1.2.4 Estructura de los genes de los receptores de endotelina y regulación de su expresión.	
1.2.5 Aislamiento y purificación de los receptores de endotelina.	
1.2.6 Mecanismos de transducción de la señal.	
1.3. Efectos fisiológicos de las endotelinas.....	15
1.3.1 Sistema vascular.	
1.3.2 Sistema nervioso.	
1.3.3 Otros órganos y sistemas.	
1.4. Endotelinas y ojo.....	19
1.4.1 Estructura general del ojo.	
1.4.2 Síntesis y localización de las endotelinas en el ojo.	
1.4.3 Localización de los receptores de las endotelinas en el ojo.	
1.4.4 Actividad de las endotelinas en el ojo.	
1.5. Las endotelinas y la diabetes.....	23
1.6. Las endotelinas y la retinopatía diabética.....	25
1.6.1 Estructura de la retina y retinopatía diabética.	
1.6.2 Lesiones vasculares en la retinopatía diabética.	



1.6.3 Alteración de la barrera hematorretiniana.	
1.6.4 Factores de crecimiento implicados en la retinopatía diabética.	
1.6.5 Implicación de las endotelinas en la retinopatía diabética.	
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1. Aparatos y reactivos.....	39
3.1.1 Aparatos.	
3.1.2 Reactivos.	
3.2. Animales.....	41
3.2.1 Condiciones generales.	
3.2.2. Pautas de tratamiento.	
3.2.2.1 Administración de la streptozotocina.	
3.2.2.2 Administración de la insulina.	
3.2.3 Estudio evolutivo.	
3.2.4. Obtención y preparación de muestras.	
3.2.4.1 Sacrificio de los animales.	
3.2.4.2 Plasmas.	
3.2.4.3 Disección de las retinas.	
3.2.4.4 Preparación de las membranas celulares de retina.	
3.2.4.5 Congelación de los ojos para la realización de las secciones con el criostato.	
3.2.4.6. Realización de las secciones con el criostato.	
3.2.4.6.1 Preparación de portaobjetos con poli-L-lisina.	
3.2.4.6.2 Realización de las secciones con el criostato.	
3.3 Diseño experimental.....	46
3.4. Métodos analíticos.....	48
3.4.1 Cuantificación de la insulina inmunorreactiva en el plasma.	
3.4.2. Análisis inmunohistoquímico.	
3.4.2.1 Fijación e incubación de las secciones para estudiar la presencia del antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación.	
3.4.2.2 Fijación e incubación de las secciones para estudiar la presencia y distribución de la ET-1-IR.	
3.4.2.3 Revelado de las secciones.	
3.4.3. Ensayos de unión de la endotelina a sus receptores en las membranas de retina.	
3.4.3.1 Ensayos de saturación.	

3.4.3.2 Ensayos de competición para calcular el porcentaje de receptores tipo A (ETA) y tipo B (ETB).	
3.4.4 Experimentos de unión covalente de afinidad (cross-linking) de <sup>125</sup> I-ET-1 y <sup>125</sup> I-ET-3 a las membranas de retina.	
3.4.4.1 Incubación de las membranas	
3.4.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.	
3.4.5. Microautorradiografía.	
3.4.5.1 Incubación de las secciones de los ojos.	
3.4.5.2 Fijación de las secciones.	
3.4.5.3 Inmersión de los cortes histológicos en emulsión fotográfica.	
3.4.5.4 Análisis de los resultados de microautorradiografía.	
3.4.6. Cuantificación de la ET-1 inmunorreactiva en plasma.	
3.4.6.1 Extracción de la ET-1 inmunorreactiva.	
3.4.6.2 Radioinmunoanálisis de ET-1.	
3.5 Análisis de los datos.....	59
4 RESULTADOS.....	60
4.1. Parámetros bioquímicos y metabólicos.....	61
4.1.1 Peso corporal.	
4.1.2 Glucemia.	
4.1.3 Insulina inmunorreactiva.	
4.2. Análisis inmunohistoquímico de las secciones de ojo y del precipitado de membranas.....	64
4.2.1. Análisis de las secciones de ojo.	
4.2.1.1 Distribución del antígeno relacionado con el factor VIII de coagulación.	
4.2.1.2 Distribución de la ET-1-IR.	
4.2.2 Análisis de las secciones de los precipitados de las membranas de retinas.	
4.3. Ensayos de unión de la endotelina a sus receptores en las membranas de retina.....	66
4.3.1 Ensayos de saturación.	
4.3.2 Ensayos de competición para calcular el porcentaje de receptores tipo A (ETA) y tipo B (ETB) de endotelina.	
4.4 Experimentos de unión covalente de afinidad (cross-linking) de <sup>125</sup> I-ET-1 y <sup>125</sup> I-ET-3 a las membranas de retina.....	75
4.5. Microautorradiografía.....	77

4.5.1 Secciones incubadas con  $^{125}\text{I}$ -ET-1.  
 4.5.2 Secciones incubadas con  $^{125}\text{I}$ -ET-3.

4.6 Medida de la ET-1-IR en plasma.....81

5 DISCUSIÓN.....83

6 CONCLUSIONES.....104

7 BIBLIOGRAFÍA.....107

8 ABREVIATURAS.....138

9 ÍNDICE.....141

