

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

Efecto del bosentán sobre la función vascular e inflamación de pacientes diabéticos con enfermedad arterial periférica

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Antonio Martín Conejero

Directores

Francisco Javier Serrano Hernando
Antonio López Farré
Guillermo Moñux Ducajú

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TÍTULO: EFECTO DEL BOSENTÁN SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR E INFLAMACIÓN DE PACIENTES DIABÉTICOS CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA.

AUTOR: ANTONIO MARTÍN CONEJERO

MADRID, 12 DE JUNIO DE 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TÍTULO: EFECTO DEL BOSENTÁN SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR E INFLAMACIÓN DE PACIENTES DIABÉTICOS CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA.

AUTOR: ANTONIO MARTÍN CONEJERO

DIRECTORES DE TESIS:

FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO

ANTONIO LÓPEZ FARRÉ

GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ

MADRID, 12 DE JUNIO DE 2013

**D. FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA
Y JEFE DEL SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR DEL
HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID**

CERTIFICA:

Que **Don Antonio Martín Conejero** ha realizado bajo su dirección y supervisión la
tesis titulada

**“EFECTO DEL BOSENTÁN SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR E INFLAMACIÓN DE
PACIENTES DIABÉTICOS CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA”**

con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para
ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en

Madrid a de de 2014.

D. Francisco Javier Serrano Hernando

D. ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y

JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN CARDIOVASCULAR DEL

HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID

CERTIFICA:

Que **Don Antonio Martín Conejero** ha realizado bajo su dirección y supervisión la

tesis titulada

**“EFECTO DEL BOSENTÁN SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR E INFLAMACIÓN DE
PACIENTES DIABÉTICOS CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA”**

con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para

ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en

Madrid a de de 2014.

D. Antonio José López Farré

D. **GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ**, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y MÉDICO
ADJUNTO DEL SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR DEL HOSPITAL
CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID

CERTIFICA:

Que **Don Antonio Martín Conejero** ha realizado bajo su dirección y supervisión la
tesis titulada

**“EFECTO DEL BOSENTÁN SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR E INFLAMACIÓN DE
PACIENTES DIABÉTICOS CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA”**

con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para
ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en

Madrid a de de 2014.

D. Guillermo Moñux Ducajú

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS.

- A Rosa, mi apoyo, mi camino, la luz.
- A mis hijos, el motivo de ilusionarme cada día por lo que hago.
- A mis padres, por apostar por mí.

Quiero agradecer en primer lugar a todos los sujetos que dieron parte de su sangre de forma absolutamente altruista y generosa para llevar a cabo la presente tesis.

Esta tesis es el resultado del esfuerzo de muchas personas.

Javier, jefe, gracias por tus enseñanzas. Eres un ejemplo. A mis compañeros, de los he aprendido y con los que me he formado: Teresa, Luis, Rodrigo, Ángel y Willi.

Gracias Guillermo por hacer posible esta tesis. A todos los compañeros con los que he compartido horas de dedicación. A mis residentes, que son un ejemplo de alegría y amor al trabajo. Manuela gracias por tu esfuerzo. A todas los compañeros de la Unidad de Investigación, en especial a Antonio (es un privilegio trabajar con gente como tú) y Javi, que hacen que cualquier trabajo sea muy fácil.

Gracias a todos.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. BIOLOGÍA DE LA PARED ARTERIAL	15
1.1.1. Anatomía de la pared arterial	15
1.1.1.1. Capa íntima	15
1.1.1.2. Capa media	17
1.1.1.3. Capa adventicia	17
1.1.2. Principales tipos celulares	18
1.1.2.1. Células endoteliales	18
1.1.2.2. Células musculares lisas	18
1.2. ARTERIOESCLEROSIS: UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA	19
1.2.1. Estrés oxidativo. Disfunción endotelial	19
1.2.2. Arteriosclerosis: formación y progresión de la placa de ateroma ...21	21
1.2.2.1. Inicio de la arteriosclerosis. Adhesión leucocitaria21	21
1.2.2.2. Disregulación del tono vascular	24
1.2.2.3. Migración de los leucocitos	25
1.2.2.4. Transformación de los leucocitos y acumulación de lípidos	27
1.2.2.5. Progresión de la placa de ateroma	29
1.2.2.6. Rotura de la placa de ateroma	31
1.3. ENDOTELINA	34
1.3.1. Bioquímica	34

1.3.2. Regulación de la expresión de ET-1	36
1.3.3. Efectos fisiológicos y fisiopatológicos	39
1.4. RECEPTORES DE ENDOTELINA	41
1.4.1. Generalidades	41
1.4.2. Bloqueantes de los receptores de la endotelina.	43
1.4.2.1 <i>Tipos.</i>	44
1.4.2.2 <i>Efectos.</i>	44
1.5. DIABETES MELLITUS Y ENDOTELINA	45
1.6. ENDOTELINA Y ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA (EAP)...	51
1.6.1 Papel potencial de la ET-1 en la EAP	51
1.6.1.1 <i>Niveles elevados de ET-1 en pacientes con EAP</i>	51
1.6.1.2. <i>Niveles elevados de ET-1 y de los receptores de endotelina en</i> <i>arterial humanas enfermas.</i>	51
1.6.1.3 <i>Papel de la ET-1 en arterias enfermas.</i>	52
1.6.2. ET-1 y daño microvascular	52
2. HIPÓTESIS.....	55
3. OBJETIVOS.....	56
4. PACIENTES Y MÉTODO.....	57

4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	58
4.2. DETERMINACIONES DE PROTEÍNAS MEDIANTE PROTEÓMICA	59
4.2.1. Electroforesis bidimensional	59
4.2.1.1 <i>Material utilizado</i>	60
4.2.1.2 <i>Preparación de las muestras</i>	61
4.2.1.3 <i>Primera dimensión</i>	62
4.2.1.4. <i>Segunda dimensión</i>	67
4.2.1.5. <i>Tinción</i>	67
4.2.2 Adquisición de imágenes y análisis	69
4.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	70
4.3.1. Material utilizado	70
4.3.2. Método	71
4.4. WESTERN BLOT. DOT BLOT	75
4.4.1. Material empleado	76
4.4.2. Preparación de las muestras	76
4.4.3. Electroforesis en gel	78
4.4. ELISA.....	83
4.5. KIT DE NITRATOS Y NITRITOS.....	86
5. ESTUDIO ESTADÍSTICO	87

6. RESULTADOS	88
6.1. DATOS DEMOGRÁFICOS	88
6.2. NIVELES DE ENDOTELINA (ET-1), IL-6, IL-10	91
6.3. LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	94
6.4. EXPRESIÓN DE RECEPTORES ET-A Y ET-B.	94
7. DISCUSIÓN	96
8. CONCLUSIONES	108
9. BIBLIOGRAFÍA	110
10. SUMMARY	128

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOLOGÍA DE LA PARED ARTERIAL

1.1.1. Anatomía de la pared arterial

La pared arterial posee una estructura común en todo el árbol arterial, estando conformada por un tejido conectivo organizado en el que se incluyen células y una matriz de fibras dispuestas en tres capas: la íntima, la media y la adventicia (Fig. 1.1).

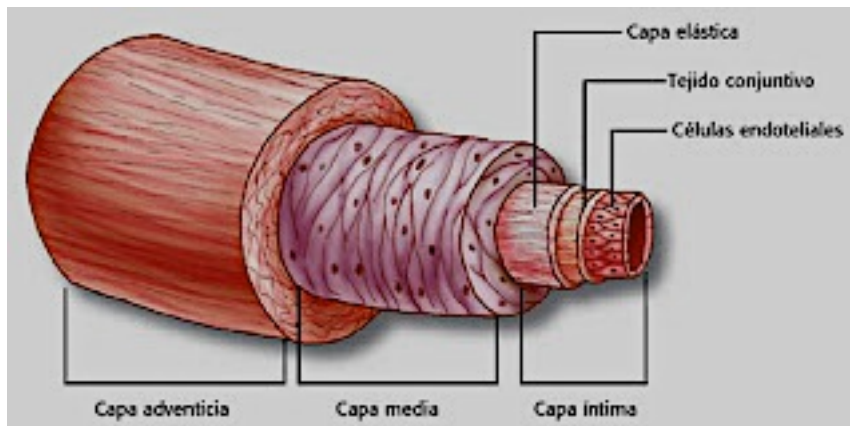


Figura 1.1. Anatomía de la pared vascular. Estructura de las capas íntima, media y adventicia.

1.1.1.1. *Capa íntima*

La capa íntima es la capa más interna de la arteria y se extiende desde la luz del vaso hasta la lámina elástica interna. Está compuesta por el endotelio, una capa subendotelial de tejido conjuntivo y una capa elástica o fenestrada.

El endotelio está constituido por una serie de células poligonales, ovaladas o fusiformes, que se encuentran en contacto directo con el torrente sanguíneo. La superficie luminal es lisa y regular (Clark 1976). Esta capa constituye un revestimiento continuo con propiedades antitrombóticas debido a la existencia de una capa de glicoproteínas o glucocálix cubriendo dichas células endoteliales (Levi 1999). El glucocálix, además, reduce la fricción del flujo sanguíneo y sirve como barrera para evitar la pérdida de líquido a través de la pared vascular. En los procesos inflamatorios el glucocálix de las células se rompe para permitir el acceso de los leucocitos y puede ser el origen de lesiones ateroscleróticas (Smith 2003).

Las células endoteliales (CE) se encuentran típicamente alineadas en la dirección del flujo sanguíneo y las uniones entre ellas son de gran importancia como fuerza mecánica y para la permeabilidad de la capa. De hecho, existen zonas de unión firme entre las células, la zona *occludens* (uniones herméticas) y la zona *adherens* (uniones adherentes). Estas uniones herméticas constituyen un barrera de transporte entre las células y ayudan a mantener la polaridad de la membrana (Levy 1999).

Inmediatamente externa al endotelio se encuentra la lámina basal, que actúa como soporte mecánico y para la regeneración de las CE. Esta membrana posee un papel fundamental en la permeabilidad vascular, está involucrada en la formación del trombo y constituye un barrera para la migración celular (Kramer 1984). La lámina basal está formada por glicoproteínas, moléculas de adhesión

como la laminina y la fibronectina, proteoglicanos y microfibrillas de colágeno tipo IV y V (Wight 1989). La capa reticular subyacente al endotelio está compuesta por colágeno tipo I y III producido por las CE y las células musculares lisas (CML).

Durante el funcionamiento normal, la monocapa de endotelio se encuentra en un estado quiescente y las uniones célula-célula inhiben la proliferación, lo que resulta en un bajo índice mitótico y contribuye a la estabilidad e integridad de la pared vascular (Sidawy 1997).

1.1.1.2. Capa media

La capa media se extiende desde la lámina elástica interna hasta la adventicia. Está constituida por CML, elastina y fibras de colágeno perfectamente ordenadas (Dobrin 1999). Las capas de CML forman grupos de células con una orientación similar, rodeados por una lámina basal común en íntima relación con un entramado de fibras de colágeno tipo III. Este sistema altamente integrado implica que un elemento no puede extenderse sin extensión de otro.

1.1.1.3. Capa adventicia

La adventicia se extiende desde la lámina elástica externa hasta el tejido conectivo perivascular contiguo. Esta capa contiene los *vasa vasorum* y estructuras nerviosas, que proporcionan nutrición a la adventicia y contribuyen a la regulación de la función de la CML de la capa media, respectivamente. Las fibras vasomotoras inducen vasodilatación mediante receptores β adrenérgicos y vasoconstricción mediante α adrenérgicos. El estímulo nervioso se transmite a las CML más

externas mediante uniones neuromusculares y, posteriormente, la señal es transmitida a las más internas por señales eléctricas entre células adyacentes (Fig. 1.1).

1.1.2. Principales tipos celulares

1.1.2.1. *Células endoteliales*

La superficial arterial en contacto con el torrente sanguíneo, o superficial luminal, está cubierta por el endotelio, como se ha indicado con anterioridad. Las CE son muy activas metabólicamente, desempeñando un importante papel en muchas funciones fisiológicas como el control de tono vasomotor, adhesión de determinados tipos celulares, el balance hemostático, permeabilidad, proliferación y la inmunidad innata y adaptativa.

Para mantener la fluidez de la sangre, las CE expresan una serie de factores que mantienen los mecanismos de formación del trombo controlados mientras se mantenga la integridad de la pared. El carácter antitrombótico del endotelio se debe en parte a su superficie aniónica proporcionada por la alta proporción de heparán sulfato y condroitín sulfato. Las células previenen la agregación plaquetaria a través de la actividad ADP-asa de la superficie, la síntesis de prostaglandinas y la liberación de óxido nítrico (NO). El normal funcionamiento de este sistema permite un balance entre los mecanismos pro- y antitrombóticos a favor de la anticoagulación.

1.1.2.2. *Células musculares lisas*

La principal función de las CML consiste en mantener una presión y flujo normales en los vasos sanguíneos mediante el control del calibre de los mismos por contracción y relajación. Son responsables de la remodelación vascular y del tono vascular mediante la síntesis de moléculas como la endotelina, de la proliferación, de la migración y de la expresión proteica. Sintetizan componentes como el colágeno, la elastina, glicoproteínas y proteoglicanos, que contribuyen a la elasticidad de la pared vascular. Estos cambios ocurren en respuesta a situaciones crónicas, como la arterioesclerosis.

1.2. ARTERIOESCLEROSIS: UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA

1.2.1. Estrés oxidativo. Disfunción endotelial

Diferentes estudios han asociado al estrés oxidativo en la patogenia de muchas enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, la arteriosclerosis y la insuficiencia cardiaca congestiva. Esta situación es causada por un desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo (del inglés ROS), que incluyen los radicales libres de oxígeno y los peróxidos, y la capacidad de detoxificar rápidamente los reactivos inmediatos o reparar el daño resultante. Durante el metabolismo aerobio se generan constantemente pequeñas cantidades de ROS, incluyendo radicales hidroxilo, aniones superóxido y peróxido de hidrógeno, como respuesta a estímulos internos y externos. Estas mínimas concentraciones de ROS pueden ser indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares (proliferación celular, apoptosis...), la inmunidad y la defensa contra

organismos. Todas las células mantienen un entorno reductor gracias a enzimas que sostienen este estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Las fuentes de ROS incluyen componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial: xantina oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, hemooxigenasa, NADH/NADPH oxidasa y NO sintasa. Altas dosis o una eliminación inadecuada de ROS dan lugar a una situación de estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daños en macromoléculas biológicas. Por ello, es necesario que se mantenga un estricto equilibrio en los niveles sistemas antioxidantes enzimáticos y varios tipos de mediadores (factores de crecimiento, prostaglandinas y NO). Entre las enzimas antioxidantes destacan la superóxidodismutasa, la glutatión peroxidasa y catalasa y el glutatión.

La producción de ROS es una alteración comúnmente asociada a la arteriosclerosis. Bajo una situación de estrés oxidativo, la vida media del NO se reduce y la formación del anión peroxinitrito induce una peroxidación lipídica, disrupción de las membranas celulares, la señalización y la supervivencia celular (Rubanyi 1986).

La *disfunción endotelial* se considera una de las primeras manifestaciones de las enfermedades cardiovasculares, en especial la arteriosclerosis. Como se ha mencionado con anterioridad, el endotelio no es una mera capa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos, sino una estructura altamente especializada, metabólicamente activa, que regula la interacción de las células y las proteínas circulantes con las células de la propia pared, ejerciendo un papel clave como sensor y transmisor de señales. Diversos factores pueden producir una modificación en las funciones del endotelio y provocar lo que se ha denominado disfunción endotelial.

La disfunción endotelial puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y al incremento de la permeabilidad vascular y que puede facilitar el desarrollo de arterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis (Badimón 2002, Badimón 2003).

El endotelio permite un tráfico selectivo de macromoléculas, pero cuando se produce este desequilibrio se observa una pérdida progresiva para controlar el paso de determinadas macromoléculas hacia el interior, como el fibrinógeno y las proteínas de baja densidad (LDL). Este incremento en la permeabilidad parece vinculado con un proceso de contracción celular mediado por calcio y con una desorganización del citoesqueleto celular (Badimón 2006).

El paso de LDL a través del endotelio se produce a favor de gradiente de concentración mediante un proceso de transcitosis no mediado por receptor. Se cree que la desorganización de las fibras de actina y la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina es el efecto que facilita este tránsito (Zhao 1997).

La disfunción endotelial implica una alteración profunda de su patrón de expresión génica, lo que conlleva la inducción de genes que, en condiciones fisiológicas, estarían reprimidos y la inhibición de otros expresados en condiciones normales. En este sentido, se produce una diferente modulación de la expresión proteica de las células endoteliales.

1.2.2. Arteriosclerosis: formación y progresión de la placa de ateroma

1.2.2.1. Inicio de la arteriosclerosis. Adhesión leucocitaria

El inicio y progresión de la arteriosclerosis están caracterizados por la acumulación de monocitos y linfocitos-T en la pared arterial. La activación del endotelio conlleva la expresión/secreción de citoquinas, como la interleuquina 1 (IL-1), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), el fibroblástico básico (bFGF) y los factores quimiotácticos (proteína 1 quimiotáctica para monocitos [MCP-1]), y la exposición de proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) para receptores específicos de leucocitos circulantes (Cybulsky 1991). Los grupos de moléculas más importantes de CAM implicados en este proceso son las selectinas (denominadas así por su similitud con la familia de las lectinas) y la superfamilia de las inmunoglobulinas. Mientras que las selectinas median en la adhesión transitoria de los leucocitos con el endotelio, las inmunoglobulinas median en una unión más sostenida. Dentro de las selectinas destaca el papel de la P-selectina, la cual parece estar involucrada en procesos iniciadores de aterogénesis, ya que está sobreexpresada en placas de ateroma humanas (Vora 1997). Dentro de las inmunoglobulinas destaca la VCAM-1 (molécula de adhesión vascular-1), una molécula de adhesión endotelial-leucocitaria que parece ser una de las principales moléculas para la adhesión temprana de leucocitos al endotelio arterial en lugares de iniciación de la placa de ateroma (Libby 2002). Distintos estudios en animales muestran que la VCAM-1 se expresa temporalmente en sitios de formación de lesiones ateromatosas, como ocurre en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol y en ratones deficientes en apolipoproteína E (Iiyama 1999).

El proceso de adhesión comienza con el deslizamiento de los leucocitos por la superficie endotelial, la posterior adhesión y, finalmente, la transmigración. La fase de rodamiento y adhesión es el resultado de una interacción específica entre

los leucocitos y las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio. El evento desencadenante de la expresión de receptores linfocitarios en las CE es la acumulación de lipoproteínas oxidadas de baja densidad (LDLox). Estas LDLox parecen ser uno de los factores proinflamatorios más importantes durante los procesos arterioscleróticos (Farmer 2002). El efecto proinflamatorio de las moléculas de LDLox implica la aparición de peróxidos y otra serie de radicales libres. Las LDLox junto con aldehídos de cadena pequeña y citoquinas proinflamatorias como la IL-1 son capaces de producir una alteración profunda en el patrón de expresión génica de las CE, lo que conlleva la inducción de genes que en condiciones fisiológicas estarían inhibidos (Fig. 1.2). En los últimos años se han acumulado evidencias que subrayan la relevancia del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) como común denominador en la expresión coordinada de genes inducidos por estas moléculas proinflamatorias (Hajjar 1997). El NF- κ B posee un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria e inmunitaria, controlando la transcripción de genes que codifican para multitud de moléculas como interleuquinas (IL-1, IL-6 e IL-8), el TNF- α , factores estimuladores de la formación de colonias de granulocitos/macrófagos (G-CSF, M-CSF, GM-CSF), varias moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1)(Collins 2001), antígenos de clase II y anticuerpos (Bourcier 1997).

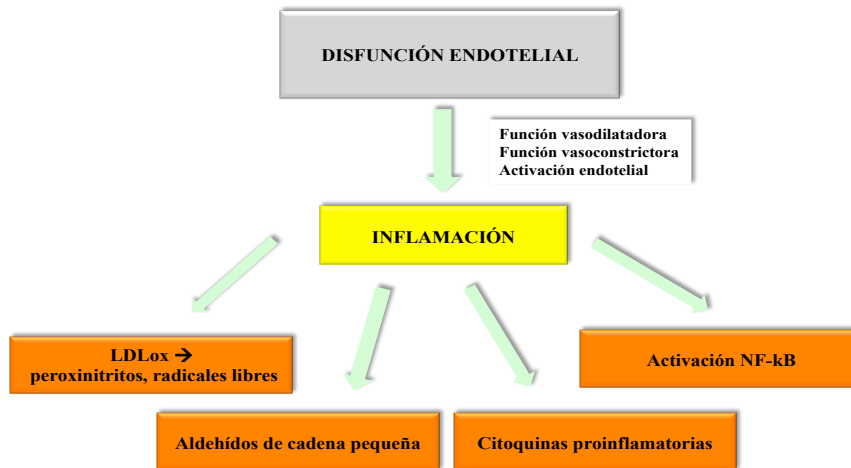


Figura 1.2. Esquema de los procesos iniciadores de la aterosclerosis.

1.2.2.2. *Disregulación del tono vascular*

El NO, sintetizado por el endotelio, es una de las molécula que puede clasificarse como ateroprotectora, ya que posee un efecto vasodilatador, antiagregante plaquetario, inhibidor de la proliferación de las CML, antioxidante e inhibidor de la expresión de las CAM (IL-1 e interferón γ [INF- γ] (De Caterina 1995)) y de la adhesión de monocitos a la pared arterial. A nivel transcripcional, el NO induce la expresión de κB , el inhibidor endógeno de NF- κB , inhibiendo los efectos proinflamatorios de NF- κB . Por ello, al ser una molécula clave en numerosos procesos homeostáticos locales, cuando se produce una alteración en su producción se favorece el desarrollo de lesiones arterioscleróticas. Como veremos más adelante, moléculas como la endotelina antagonizan en determinadas circunstancias el efecto del NO.

La traducción más temprana de un endotelio disfuncionante es la disminución de la capacidad vasodilatadora, como se ha demostrado en pacientes

con diversos factores de riesgo cardiovascular (Zeiger 1991). Se piensa que la oxidación de moléculas de LDL puede ser modulada por el NO y sus productos. A su vez, las LDLox pueden inhibir la producción de NO por diferentes mecanismos:

- 1) disminución de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), como se ha demostrado en estudios *in vitro* (Liao 1995);
- 2) aumento de la degradación del NO (Martínez-González 2001);
- 3) aumento de la fracción de eNOS unida a caveolina (por tanto, insensible a la regulación por calcio-calmodulina (Feron 1999)).

La importancia *in vivo* de estos mecanismos de disminución del NO se demuestra por la menor expresión de la eNOS en lesiones arterioscleróticas (Oemar 1998).

En condiciones de flujo laminar, las CE están sometidas a un estrés continuo que promueve una actividad continua de la eNOS, produciendo una síntesis basal de NO. Diferentes autores afirman que esta producción basal de NO protegería al endotelio ante estímulos aterogénicos. Por el contrario, en aquellas zonas en las que existe un flujo turbulento, como en las bifurcaciones arteriales, se produciría una alteración en la actividad de la eNOS, predisponiendo a estas zonas a la formación de una lesión arteriosclerótica. Esta teoría podría explicar por qué las zonas de ramificación arterial están más predispuestas a la formación de placas de ateroma (Gimbrone 1997).

1.2.2.3. Migración de los leucocitos

Como se ha mencionado con anterioridad, la actividad inflamatoria desencadenada por la acumulación de LDLox estimula en las CE la producción de distintas moléculas proinflamatorias, como la ICAM-1, VCAM-1, P-selectina o E-

selectina. El rodamiento representa la interacción entre los leucocitos y las selectinas, con la consiguiente adhesión, en la que toman parte las inmunoglobulinas (ICAM yVCAM). La sobreexpresión de las CAM, junto con la inducción de sustancias quimioatrayentes como la MCP-1, facilita la unión y la migración de los monocitos al espacio subendotelial (Holvoet 2006). La consecuencia final es una acumulación de monocitos en la pared vascular secundaria a la situación proinflamatoria. Otras moléculas de adhesión importantes incluidas en los monocitos incluyen integrinas, la Mac-1 (CD11b/CD18) o el antígeno muy tardío 4 y la molécula celular 1 de adhesión a plaquetas/endotelio.

Otras moléculas de la superfamilia de la C-X-C quimioquinas, como la IL-8, el factor de crecimiento regulador de oncogenes (GRO), el IFN- γ y el factor plaquetario 4 (PF4), son ampliamente reconocidas como predominantes quimioatrayentes de neutrófilos y/o linfocitos(Hoch 1996). Boisvert et al (Boevister 1998) demostraron que la IL-8 posee un papel fundamental en la localización de los macrófagos en las lesiones arterioscleróticas y su progresión.

Estudios previos han demostrado la presencia de linfocitos T CD4+ e IFN- γ tanto en lesiones arterioscleróticas humanas como de ratón(Hansson 1991). El IFN- γ posee un papel crítico en la modulación de la respuesta inmune estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias (IP-10, MIG, I-TAC y citoquinas CXC), moléculas de adhesión en las células endoteliales, CML y macrófagos. El IFN- γ también estimula la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II en las CML, activando a más linfocitos T y macrófagos y produciéndose así un feed-back positivo. Por tanto, una vez reclutados, los linfocitos pueden perpetuarse y amplificar la respuesta inflamatoria inicial.

1.2.2.4. Transformación de los leucocitos y acumulación de lípidos

En los últimos años, el importante papel de la inflamación en la arteriosclerosis se ha centrado en el sistema inmune. La inmunidad innata representa el primer paso en la respuesta inflamatoria y está basada en los macrófagos y las células dendríticas (Gordon 2002). Una vez los monocitos reclutados pasan al espacio subendotelial de la pared arterial adquieren las características morfológicas de los macrófagos y posteriormente sufren una serie de cambios que les llevan a la formación de células espumosas. En el desarrollo de la arteriosclerosis, los receptores más importantes para la inmunidad innata son los llamados receptores scavenger y los toll-like receptors (TLR)(Anderson 1997). Rosenfeld et al (Rosenfeld 1992) demostraron la expresión de mRNA y la presencia de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) en lesiones ateroscleróticas en humanos y conejos. El M-CSF es una glicoproteína expresada por distintos tipos celulares como monocitos y macrófagos, CE, fibroblastos y linfocitos(Rambaldi 1997, Rajavashisth 1990, Sieff 1988, Hallet 1991) y constituye una de las principales moléculas en la transformación de los monocitos. En un primer tiempo, los receptores scavenger SR-A y CD-36 son los responsables del reclutamiento de las LDLox y la transformación de los macrófagos en células espumosas (Steinberg 2002). Además, se produce la activación del NF- κ B, lo que desencadena un potente ciclo quimioatrayente de monocitos y formación de macrófagos/células espumosas (MCP-1, leucotrieno LTB₄). El M-CSF aumenta la expresión de receptores scavenger SR-A, citoquinas y factores de crecimiento, promoviendo la diferenciación y proliferación de las células espumosas(Clinton

1992). Junto con el incremento de SRA se produce un aumento en la expresión de CD36, lo que favorece la internalización por los monocitos de las lipoproteínas modificadas como ésteres de colesterol de compartimentos celulares. Finalmente, estos macrófagos cargados de lípidos se denominan células espumosas y son característicos de las lesiones arterioscleróticas. A su vez, estos macrófagos modificados producen citoquinas que activan a las CML circundantes, resultando en formación de colágeno y fibrosis (Libbi 2002) (Fig. 1.3).

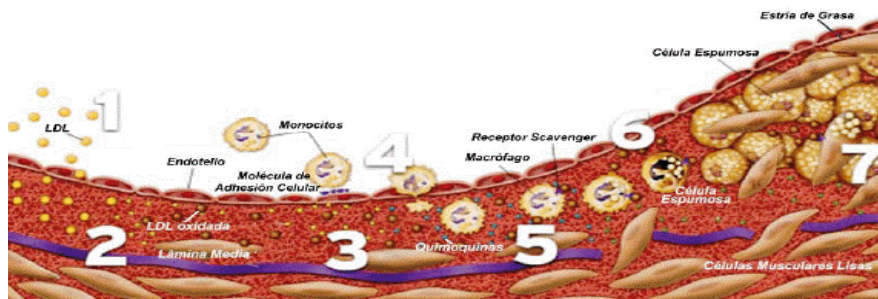


Figura 1.3. Etapas de la formación de la placa arteriosclerótica. 1 y 2, entrada de las lipoproteínas en el espacio subendotelial y oxidación. 3, 4 y 5, liberación de factores de crecimiento y citoquinas que promueven la diapédesis de monocitos y su diferenciación en macrófagos. 6, formación de células espumosas por la internalización de lipoproteínas modificadas y oxidadas. 7, establecimiento de la estría grasa por la acumulación de células espumosas (Modificado de Faxon et al (Faxon 2004)).

El factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) también puede promover la inflamación en las lesiones arterioscleróticas, ya que ayuda a la supervivencia de fagocitos mononucleares que contienen mieloperoxidasa (MPO). La MPO es una enzima que da lugar a un aumento de un

ácido prooxidante, el ácido hipocloruro, el cual es una importante fuente de estrés oxidativo e inflamación en la placa de ateroma humana(Sugiyama 2001).

Schönbeck et al (Schönbeck 2000) demostraron la implicación del CD40 y su ligando CD40L (CD154) tanto en los estadios iniciales de la arteriosclerosis como en el desarrollo de lesiones avanzadas. El CD40 ligando no sólo está presente en los linfocitos B, sino también en los monocitos, macrófagos y CE, sugiriendo una amplia función in vivo. Henn et al (Henn 1998) demostraron la expresión de CD40L en las plaquetas a los pocos segundos de su activación in vitro y durante la formación del trombo in vivo. Del mismo modo que el TNF- α y la IL-1, el CD40L en las plaquetas induce la secreción de quimioquinas por las CE y la expresión de moléculas de adhesión para el reclutamiento y extravasación de leucocitos en la zona de la lesión. Estos resultados indican que las plaquetas no sólo están implicadas en la hemostasia, sino directamente en la iniciación de la respuesta inflamatoria en la pared arterial.

La inmunidad adaptativa es mucho más específica que la innata, pero puede tardar de días a semanas hasta estar completamente desarrollada. Se basa en la generación de receptores de linfocitos T y B e inmunoglobulinas que reconocen antígenos en la placa de ateroma. La inmunidad adaptativa constituye la base de grandes avances en el futuro cercano, como la inmunización y el desarrollo de fármacos inmunosupresores.

1.2.2.5. Progresión de la placa de ateroma

Sólo las CE, los macrófagos y algunas células T participan en el desarrollo de la estría grasa, la lesión arteriosclerótica más temprana y asintomática. La exposición

continua a factores de riesgo crea un ambiente proaterogénico que produce un incremento mayor de la quimiotaxis de monocitos y por tanto una mayor acumulación de lípidos en la placa. En el progreso de la enfermedad, la respuesta inmunoinflamatoria se asocia a una respuesta inmunoproliferativa mediada por las CML, que son las encargadas de la reparación del daño arterial. Como ocurre habitualmente, el estímulo se mantiene durante el curso de años, con lo que la respuesta *reparadora* puede hacerse muy voluminosa, ir invadiendo el lumen de la arteria y, finalmente, producir un cuadro de isquemia del territorio afectado (Kragel 1989). Sin embargo, las CML y la matriz extracelular de colágeno que producen confieren estabilidad a las placas, protegiéndolas contra complicaciones como la rotura y trombosis (Schwartz 2000).

Cuando se produce la descamación de CE vasculares las plaquetas se adhieren a la lesión, activándose y degranulando sustancias fibrogénicas, como el PDGF, promoviendo la proliferación de CML y la acumulación de matriz extracelular (Ross 1976). El PDGF aumenta la síntesis de colágeno y con ello se favorece un aumento de la capa fibrosa de la placa de ateroma. Los leucocitos infiltrados en la lesión y las CE también pueden producir PDGF. Las plaquetas también son capaces de sintetizar factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual también fomenta la proliferación de CML y la producción de colágeno intersticial.

Durante la progresión de la arteriosclerosis, las CE, los macrófagos y las CML van muriendo por apoptosis o necrosis. La apoptosis contribuye a la acción del factor tisular (TF) y a la trombogenicidad del core lipídico de la placa (Tedgui 2001).

La calcificación focal en las placas de arteriosclerosis es muy común y se incrementa con la edad (Hoffman 2003). En los procesos de mineralización están implicadas las CML vasculares (Demmer 1995), debido a su capacidad para

producir osteopontina, una proteína involucrada en la formación de hueso y la mineralización (Demmer 1999). Miembros de la familia del factor transformante también pueden favorecer la mineralización de la placa (Böstrom 1993).

1.2.2.6. Rotura de la placa de ateroma

La rotura de una placa de ateroma, y la consiguiente trombosis, es la responsable del inicio de muchos síndromes isquémicos agudos. Existen dos mecanismos que independientemente o en conjunción determinan la rotura de la placa. El primero está relacionado con fuerzas físicas y acontece más frecuentemente cuando la capa fibrosa es más fina y cuando está más intensamente infiltrada por células espumosas. El segundo mecanismo se relaciona con la actividad intraplaca de los macrófagos y mastocitos, que degradan la matriz extracelular por fagocitosis o liberación de enzimas proteolíticas (por ejemplo, metaloproteasas). Por tanto, se ha considerado que la composición y el estado de la placa, más que el grado de estenosis, son los principales responsables de la enfermedad aterotrombótica (Fuster 1992, Badimón 1999, González-Pacheco 2006).

En las últimas décadas se han observado importantes avances en el estudio de los eventos isquémicos agudos, considerándose un factor muy importante el estudio de la lesión precursora de la trombosis. La interrupción del flujo sanguíneo en la arteria enferma puede producirse por tres mecanismos distintos (Virmani 2002), como se observa en la Figura 1.4.

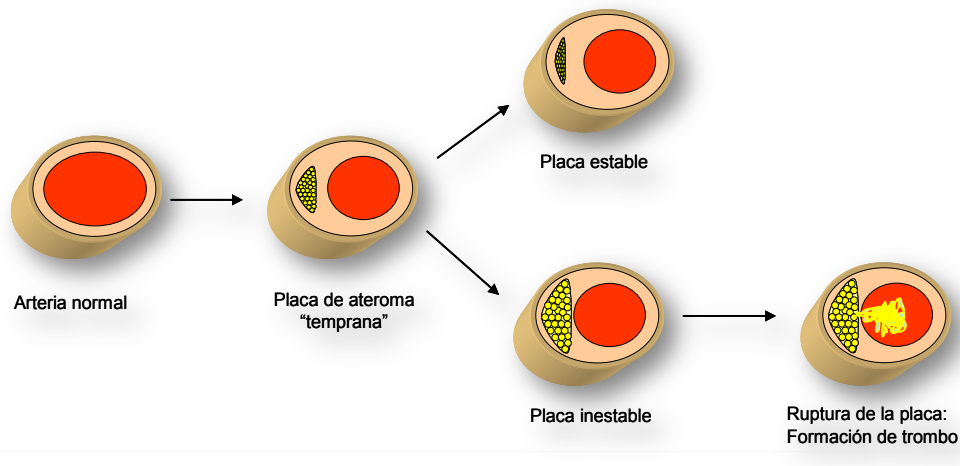


Figura 1.4. Proceso de desarrollo de la placa de ateroma, tipos de placas y sus complicaciones.

Primero, la erosión de la placa, definida como la formación aguda de trombo en contacto directo con la matriz de proteoglicanos en un área carente de endotelio. Finalmente, esto provoca la adhesión y activación plaquetaria y promueve, por tanto, la formación del trombo (Faggiotto 1994)

Segundo, la trombosis o hemorragia intraplaca. Existe una exuberante formación de microvasos en las placas de ateroma, probablemente inducida por el mismo proceso inflamatorio (De Boer 1999). Una hemorragia intraplaca produce un aumento en la deposición de fibrina y hemosiderina y la trombosis *in situ* conduce a la generación de trombina, que, junto con el fibrinógeno adherido, puede estimular la migración y progresión del músculo liso. La trombina produce activación plaquetaria estimulando la liberación de factores de crecimiento contenidos en los gránulos α -plaquetarios, como PDGF y TGF- β .

Y en *tercer lugar*, la rotura de la capa fibrosa de la placa, que es el mecanismo más común de interrupción del flujo sanguíneo y desarrollo de un evento isquémico agudo. Estas placas poseen una escasa capa (incluso ausencia)

de CML y un núcleo necrótico cubierto por una fina capa fibrosa infiltrada por macrófagos activados, que producen metaloproteinasas de matriz. Se trata de placas vulnerables con alto riesgo de rotura.

También están asociados fenómenos de apoptosis en la rotura de la placa de ateroma. Cai et al (Cai 1997) demostraron que la apoptosis regulada por FAS/APO 1 está involucrada en el desarrollo de lesiones arterioscleróticas avanzadas y que probablemente determine el acúmulo de masa en los vasos enfermos. La apoptosis dentro de la placa de ateroma compromete a todas las líneas celulares, pero con un gran predominio de los macrófagos (Kochx 1998). Estas células apoptóticas favorecen el reclutamiento de otras células inflamatorias y, por tanto, también contribuyen a todo el proceso inflamatorio. Mallat et al (Mallat 2001) demostraron la íntima asociación entre apoptosis e inflamación, coexistiendo ambos procesos en áreas de rotura de la placa. Estos mismos investigadores también encontraron niveles elevados de micropartículas de membrana procedentes de células apoptóticas en la placa arteriosclerótica (Mallat 1999) y cantidades elevadas de micropartículas de membrana con potencial procoagulante en sangre periférica.

Cuando se produce la rotura de la placa, queda expuesto el core lipídico, altamente trombogénico por su contenido en TF. Por tanto, el TF es un elemento clave en la iniciación de la cascada de la coagulación, siendo esencial en la trombosis que sigue a la disrupción de la placa. La actividad es muy dependiente de la presencia de la fosfatidilserina, un fosfolípido aniónico que se redistribuye en la superficie de la membrana celular durante la muerte por apoptosis, confiriendo un potencial trombogénico a la célula apoptótica (principalmente los macrófagos). La mayoría del TF expresado dentro de la placa de ateroma se ha encontrado en áreas de alta densidad de células apoptóticas y de micropartículas. Además de

activar la cascada de la coagulación, el TF activa consecuentemente a las plaquetas circulantes y a los leucocitos, tanto neutrófilos como monocitos (Ott 1996) , que interactúan llevando a la formación del trombo.

Además, moléculas de CD40-L unido a las plaquetas son capaces de incrementar aún más el estado proinflamatorio y protrombótico. Incluso en ausencia de fisuras en la placa, las citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α) pueden potenciar las propiedades procoagulantes de las CE y de los neutrófilos y contribuir así a las complicaciones trombóticas de la placa de ateroma (Papanicolau 1998).

1.3. Endotelina

1.3.1 Bioquímica

En los humanos la endotelina es la molécula vasopresora más potente y de acción más duradera (Hillier et al. 2001; Maguire and Davenport 2002), siendo 100 veces más potente que la noradrenalina (Yanagisawa et al. 1988; Luscher and Barton 2000). Se libera en respuesta a situaciones de estrés teniendo una acción paracrina y autocrina (Kedzierski and Yanagisawa 2001) desarrollando diferentes acciones fisiológicas.

La concentración plasmática de ET-1 es extremadamente baja en condiciones normales, si bien localmente en la pared vascular es 100 veces mayor, lo que sugiere fundamentalmente un efecto paracrino.

La ET-1 es la isoforma biológicamente más activa y supone el 80% aproximadamente de la ET total (Yanagisawa y Masaky 1989, Ergul 2011). La ET-1

es un péptido de 21 aminoácidos con un terminal C-hidrofóbico y 2 puentes de cisteína en el terminal N. Dos péptidos estructuralmente relacionados que difieren en 2 y 6 aminoácidos, se denominan ET-2 y ET-3, respectivamente.

La ET-1 es producida diferentes células en distintos tejidos. Así se ha comprobado que es producida por el tejido vascular endotelial y por el músculo liso, por los miocitos cardíacos, por las células epiteliales respiratorias, neuronas, islotes pancreáticos, fibroblastos y macrófagos (Luscher and Barton 2000; Kedzierski y Yanagisawa 2001).

La ET-2 es expresada en el ovario y en las células epiteliales intestinales, relacionándose con la ovulación, la termorregulación y la homeostasis intestinal. En diferentes estudios se ha relacionado con la enfermedad inflamatoria intestinal (Ko et al. 2006, 2007; Chang et al. 2008).

La ET-3 se encuentra en las células endoteliales, en las neuronas cerebrales, en las células del epitelio tubular renal y en el epitelio intestinal. Está implicada en la liberación de factores vasodilatadores, incluyendo NO y prostaciclina (Kedzierski and Yanagisawa 2001).

Los precursores de la endotelina son procesados por dos proteasas para dar lugar a las formas maduras.

Las preproendotelinas son fraccionadas en los sitios dibásicos por endopeptidasas para dar lugar a unas formas intermedias inactivas denominadas *big*-endotelinas (bigETs) o proendotelinas (figura 1.4). El procesamiento está mediado por metaloproteasas, denominadas enzimas convertidoras de la endotelina (ECEs) (Kedzierski and Yanagisawa 2001).

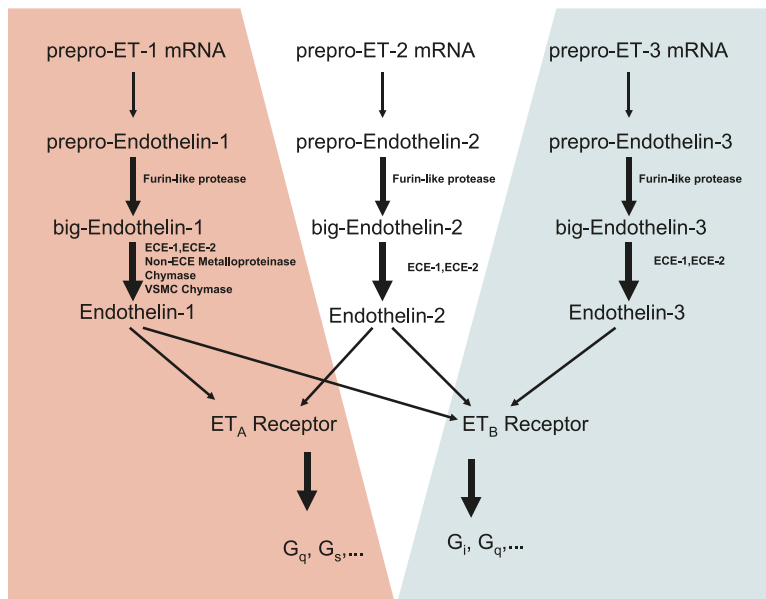


Figura 1.4. Modificaciones post-traduccionales de las diferentes formas de ET.

1.3.2. Regulación de la expresión de ET-1

Aunque la ET-1 puede ser sintetizada por diferentes tipos celulares como los miocitos, las células musculares lisas vasculares, los fibroblastos o células epiteliales, la mayoría se sintetiza en el endotelio [Yanagisawa 1988, Miyauchi 1999].

La ET-1 es sintetizada como un precursor molecular de 212 aminoácidos, que es fragmentado para originar la forma bioactiva de 21 residuos. La proteólisis se realiza fundamentalmente por las enzimas convertidoras de la endotelina (ECE-1 y ECE-2).

En cultivo de células endoteliales, la ET-1 se libera continuamente a través de una vía regulada fundamentalmente por transcripción génica. La estimulación de células en cultivo produce un rápido aumento de la ET-1, lo que sugiere que ET-1 es almacenada y secretada por exocitosis (Macarthur 1994). La ET-1 ha sido

localizada en los cuerpos de Weibel-Palade, reservorio intracelular de las células endoteliales (Rondaj 2006).

Diversos estudios experimentales han demostrado un control transcripcional en la síntesis de ET-1. El ARNm de la ET-1 está regulado por diferentes factores biológicos y farmacológicos. El *transforming growth factor-β* (TGF-β), el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), la trombina, la bradikinina, la angiotensina II, los glucocorticoides y la hipoxia aumentan los niveles de ARNm de ET-1. Por el contrario, factores vasodilatadores como el péptido natriurético auricular, el NO y fármacos como las estatinas reducen dichos niveles [Stow 2011].

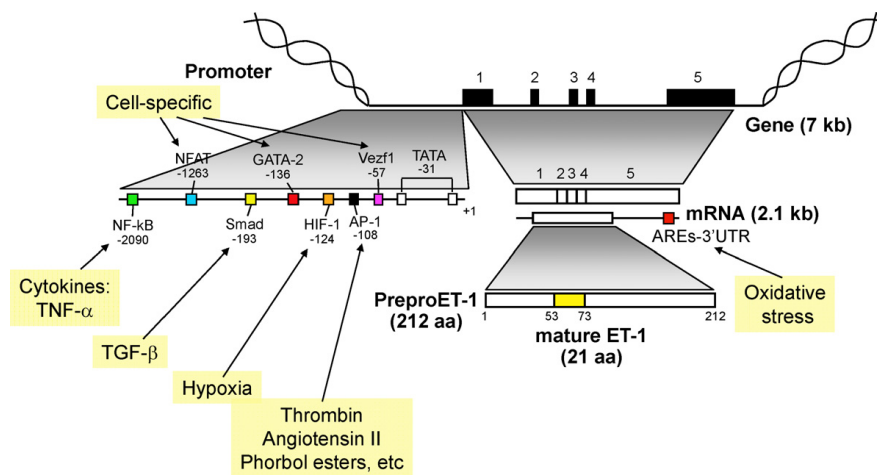


Figura 1.5. Organización del gen de la ET-1

La figura 1.5 muestra esquemáticamente la organización del gen de la ET-1. Dicho gen está localizado en el cromosoma 6 (Inoue 1989). El gen contiene 5 exones que codifican el precursor preproendotelina-1. El gen de la ET-1 está bajo el control del promotor TATA-box. Un activador funcional, la proteína 1 (AP-1), que se une a c-Fos/c-Jun ha sido identificada en células endoteliales (Lee 1991). La regulación de AP-1 es compleja y ocurre a diferentes niveles. Se ha propuesto que

el sitio AP-1 media la respuesta transcripcional a la trombina, bradiquinina y angiotensina II (Emori 1992, Imai 1992). La hipoxia induce la expresión de ET-1 en las células endoteliales y podría ser la causa primaria de la vasoconstricción y del engrosamiento de la pared vascular observada en enfermedades como la hipertensión pulmonar (Hieda 1990, Kourembanas 1991). El factor isquemia inducible-1 (HIF-1) se une al gen en la posición -124/-119, siendo crucial para estimular la respuesta a la hipoxia [Hu 1998]. La citoquina factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) es uno de los más potentes reguladores de los niveles de ET-1. TGF- β incrementa el ARNm de la ET-1 en las células endoteliales [Kurihara 1989].

Factores mediadores de la inflamación como el TNF- α y el interferon- γ , aumentan la expresión de ET-1 [Wort 2009]. Se ha demostrado que el factor TNF- α o los productos finales de la glicación (AGEp) aumentan la expresión del gen de la ET-1 mediante la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B).

La expresión de ET-1 también depende de la estabilidad del ARNm. El estrés oxidativo parece estar implicado en la síntesis de ET-1 en este punto. Se ha comprobado en estudios recientes que la enzima glicolítica gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) interacciona directamente con el gen de la ET-1 lo que implica una rápida degradación del gen del ARNm [Rodríguez Pascual 2008].

Por tanto, podemos afirmar que la producción de ET-1 está controlada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional en función de diferentes estímulos. La expresión de la ET-1 en el endotelio frente a dichos estímulos puede estar implicada en la patogénesis y en el mantenimiento de enfermedades

vasculares.

1.3.3. Efectos fisiológicos y fisiopatológicos

En la figura 1.6 se detallan algunas de las acciones fisiológicas principales de la ET. En el sistema vascular, la endotelina vía activación de los receptores ET-A, ejerce un tono basal vasoconstrictor y contribuye al desarrollo de la enfermedad vascular en la arteriosclerosis y en la hipertensión (Schiffrin 1999; Barton 2000). Se ha observado que la estimulación de la liberación de ET-1 con agentes como la trombina, está fuertemente incrementada en sujetos de edad avanzada comparado con el endotelio de ratas jóvenes, un mecanismo que podría estar implicado en la fisiopatología del tono vasomotor en la edad avanzada (Goel 2010). Así mismo, la endotelina contribuye a la contractilidad miocárdica (Maguire and Davenport 2002), al cronotropismo (Kedzierski and Yanagisawa 2001), y es arritmogénica (Proven et al. 2006). También interviene en la remodelación miocárdica que se produce en la insuficiencia cardíaca (Sakai et al. 1996).

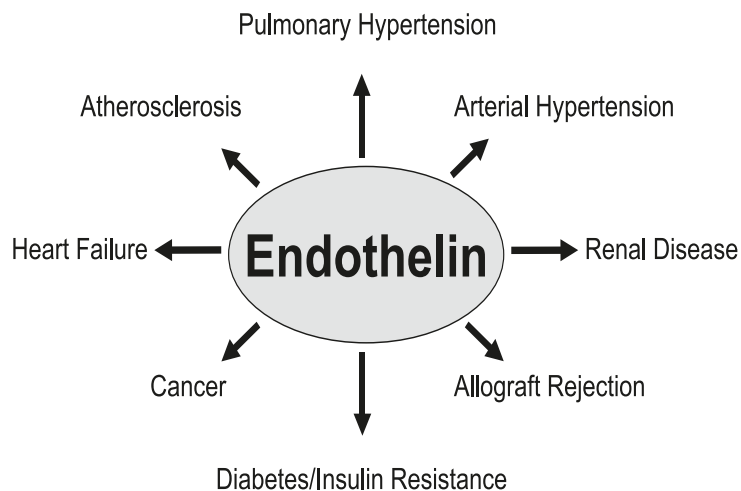


Figura 1.6. Situaciones fisiopatológicas en las que interviene el sistema endotelina (Barton 2008)

En el pulmón, el sistema endotelina regula en tono bronquial (Uchida et al. 1988) y la proliferación vascular en el árbol bronquial que está implicada en el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar (Rubin et al. 2006). A nivel renal, la endotelina también controla la excreción de sodio y agua y el equilibrio ácido-base de forma fisiológica (Kohan 2006) y, de forma patológica, acelera el desarrollo de glomerulosclerosis (Hoher et al. 1997; Remuzzi et al. 2002; Chatziantoniou and Dussaule 2005). En el cerebro, la endotelina modula los centros cardiorrespiratorios (Kedzierski and Yanagisawa 2001). Además, el sistema endotelina influye en la fisiología del sistema inmune (Nett et al. 2006) y está implicado en la homeostasis de la glucosa (Berthiaume et al. 2005; Lteif et al. 2007).

La obesidad, que se asocia frecuentemente a la hipertensión, es una condición que se encuentra frecuentemente junto a diabetes y resistencia a la insulina, interviniendo en la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Barton et al. 2003). Estudios recientes sugieren que la proteinuria en los diabéticos está directamente asociada con la activación de la ET-1 (Zanatta et al. 2008) a través de los receptores ET-A.

El tono vascular así como la actividad de la insulina son en gran medida endotelina dependientes (Traupe et al. 2002; Cardillo et al. 2004; Lteif et al. 2007; Mundy et al. 2007). Además la endotelina juega un papel importante en la adipogénesis y la lipólisis (Bhattacharya and Ullrich 2006; van Harmelen et al.

2008), por lo que el bloqueo de la endotelina podría jugar un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares, así como para el tratamiento de estados asociados a la obesidad, como la resistencia a la insulina (Berthiaume et al. 2005).

1.4. RECEPTORES DE ENDOTELINA

1.4.1 Generalidades

La ET-1 media sus diferentes efectos a través de dos diferentes subtipos de receptores ET-A y ET-B (Davenport 2002). Consisten en 2 dominios transmembrana asociados a la proteína G (Figura 1.7). El receptor ET-A muestra una afinidad sub-nanomolar por ET-1 y ET-2 y 100 veces menor afinidad por ET-3 (Kedzierski and Yanagisawa 2001). Se considera que ET-A es el receptor principal que media las funciones de vasopresión y de factor de crecimiento. Sin embargo, el receptor ET-B tiene equivalente afinidad nanomolar por los 3 tipos de endotelina. ET-B inhibe el crecimiento celular y la vasoconstricción en el lecho vascular y funciona además como un receptor de aclaramiento de ET-1, fundamentalmente en el pulmón (Luscher and Barton 2000).

Los receptores ET-A están localizados fundamentalmente en las células musculares lisas de la pared vascular y es responsable de la respuesta contráctil y vasopresora de la ET-1 (Ergul 2000).

El papel de los receptores ET-B en la regulación vascular es más compleja. Por ejemplo, los receptores ET-B localizados en el endotelio vascular median la vasodilatación a través de la liberación de factores relajantes como el NO y la

prostaciclina (PGI₂). Este subtipo de receptor sin embargo también puede condicionar vasoconstricción cuando los receptores están localizados en las células musculares lisas, igual que los receptores ET-A. Este fenómeno se observa en determinadas situaciones como la diabetes mellitus (Ergul 2011).

En consecuencia, el efecto contráctil global de la ET-1 depende fundamentalmente del tipo de receptor predominante, bien ET-A y ET-B en las células musculares lisas, bien ET-B en las células endoteliales.

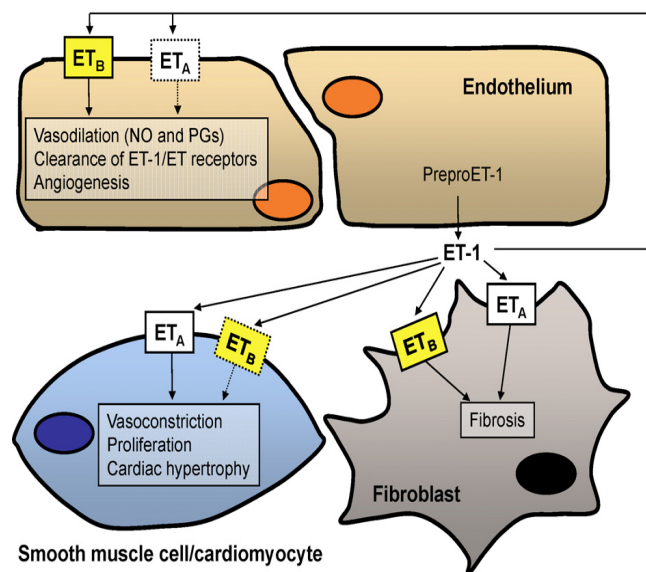


Figura 1.7. Resumen de la acción de la ET sobre los receptores ET-A y ET-B.

Algunos estudios han sugerido que los receptores ETB pueden ser vasculoprotectores (Murakoshi 2002, Chuquet 2002, Sachidanandam 2007):

- Los bloqueantes selectivos de los receptores ETB aumentan el daño cerebral isquémico (Chuquet 2002).
- La deficiencia de receptores ET-B aumenta el daño neuronal hipóxico in vivo (Siren 2002).
- Los bloqueantes ET-B están implicados en la hiperplasia que se observa tras el daño intimal que se produce en la ligadura de la carótida (Murakoshi

2002).

- El receptor ET-B está implicado en el aclaramiento de la endotelina. El bloqueo de este subtipo de receptor provoca un aumento de la ET-1 en animales y en humanos (Webb 1997). Además, la activación de este receptor ET-B en las células endoteliales condiciona un *feedback* negativo sobre la síntesis de ET-1 (Sánchez 2002).

Por tanto, cualquier descenso en la actividad de los receptores ET-B resultaría en un aumento de la síntesis de endotelina ET-1, una disminución de su aclaramiento, una disminución de la producción de NO y de PGI₂, todo lo cual resulta en una activación opuesta de la actividad ET-A.

Estos estudios demuestran en consecuencia un efecto favorable de la activación de los receptores ET-B en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en situaciones patológicas como la diabetes, la activación de los receptores ET-B puede condicionar respuestas contrarias (Ergul 2011).

1.4.2. Bloqueantes de los receptores de la endotelina.

Pocos años después del descubrimiento de la endotelina fueron clonados los receptores y poco después se obtuvieron los bloqueantes selectivos de dichos receptores (Arai et al. 1990; Eguchi et al. 1992). En 2002 bosentan fue el primer bloqueante de los receptores de la endotelina aprobado por la FDA para el tratamiento de los pacientes con hipertensión arterial pulmonar (Channick et al. 2001; Rubin et al. 2002).

1.4.2.1 Tipos.

Los tres tipos de bloqueantes de los receptores de la endotelina se resumen en la tabla 1.1:

Bloqueantes selectivos ET-A	sitaxentan, <i>ambrisentan</i> , atrasentan, BQ 123, zibotentan
Bloqueantes selectivos ET-B	BQ-788, A192621
Bloqueantes con efecto dual A-B	<i>bosentan</i> , macitentan, tezosentan

Tabla 1.1. Fármacos bloqueantes de receptores ET-A y/o ET-B. En cursiva los dos únicos aprobados para uso clínico.

1.4.2.2 Efectos.

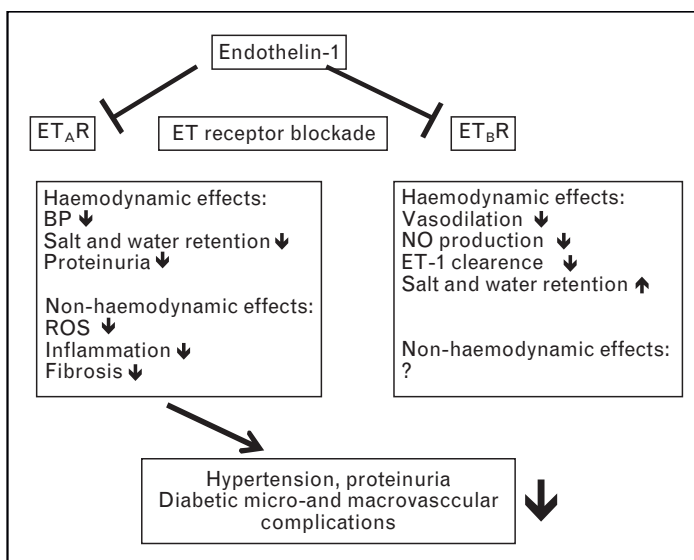


Figura 1.8. Efectos hemodinámicos de la activación de ET-A y ET-B

La figura 1.8 muestra los efectos hemodinámicos del bloqueo de receptores de endotelina. El bloqueo de ET-A reduce la presión arterial, la retención de sal y agua, la proteinuria, la producción de ROS, la inflamación y la fibrosis. El bloqueo ETB reduce la vasodilatación mediada por NO, el aclaramiento de ET-1 lo que condiciona vasoconstricción y retención hidrosalina (Karin 2012).

Los efectos metabólicos de la endotelina han sido evaluados en modelos animales de resistencia a la insulina:

- En ratas con diabetes tipo 2, el antagonismo del receptor ET-A disminuyó en metabolismo de la glucosa lo suficiente como para inducir hiperglucemia (Balsiger 2002).
- El antagonista ET-A y ET-B bosentan, disminuye la acción de la insulina en modelos de ratón con deficiencia de insulina (Said 2005).
- El atrasentan, bloqueante selectivo ET-A, redujo la velocidad de liberación de la insulina tras la ingesta en ratas con resistencia a la insulina (Berthiaume 2005).

1.5. DIABETES MELLITUS Y ENDOTELINA

Han sido descritos niveles elevados de endotelina en diferentes estados de resistencia a la insulina, incluyendo la diabetes tipo 2 (Caballero 1999, Mangiafico 1998), obesidad (Irving 2001, Piatti 1999 y Ferri 1997) y síndrome de ovario poliquístico (Diamanti-Kandarakis 2001). En diversos estudios se ha comprobado que en obesos y diabéticos, una mayor actividad de la ET-1 se ha asociado a un descenso en la vasodilatación endotelio-dependiente que caracteriza los estados

de resistencia a la insulina.

Es conocido que parte de la acción metabólica de la insulina depende de la redistribución del flujo sanguíneo (Barón 1995, Vincent 2003), regulada a través de la estimulación de NO en el endotelio (Steinberg 1994, Vincent 2003). La endotelina por tanto podría antagonizar el efecto vascular de la insulina, inhibiendo la síntesis de NO.

Numerosos estudios sugieren que la endotelina puede contribuir a la resistencia a la insulina y a la disfunción vascular. In vitro, la exposición celular mantenida a ET-1 induce resistencia a la insulina (Ishibashi 2001, Jiang 1999). Estudios moleculares han demostrado que este efecto se debe a la acción de la ET-1 a diferentes niveles. Por una parte se ha comprobado un descenso en la estimulación de la 3-fosfatidinositol kinasa (PI3-kinasa) por el receptor substrato (IRS)-1 (Ishibashi 2001), así como una alteración en la interacción entre el 4-5 fosfatidilinositolbifosfato (PIP2) y el citoesqueleto de actina (Strawbridge 2005).

Se admite generalmente que la estimulación de la 3-fosfatidilinositol kinasa es imprescindible para que se produzca el transporte de la glucosa a través de la membrana celular. El IRS-1 es uno de los principales sustratos del receptor de la insulina. Cuando se encuentran fosforilado produce un aumento de la actividad PI3-kinasa (Czech 1999).

Niveles elevados de PKC han demostrado alterar la fosforilación del receptor de la insulina, lo cual está implicado en la reducción del transporte de glucosa transmembrana y a un descenso de la sensibilidad a la insulina (Chin 1993).

En diferentes estudios se ha observado la interacción de la ET-1 y la insulina a nivel de la señal de la insulina. Tras la unión de la ET-1, el receptor ET-A activa la fosfolipasa C β . Ésta a su vez aumenta la formación de inositoltrifosfato y diacilglicerol, lo que condiciona un aumento del Ca²⁺ intracelular y la activación de la proteínkinasa C (PKC) (Imamura 1999). En los adipocitos y en las células musculares de la pared vascular, la ET-1 aumenta la resistencia a la insulina a través de un mecanismo PKC dependiente. Así mismo se ha comprobado que la endotelina disminuye la acción de la insulina a través de la interacción de la señal en la membrana celular que incluyen al PIP2 y a la interacción con la actina del citoesqueleto, influyendo negativamente en la estructura del citoesqueleto lo que podría reducir la acción de la insulina (Lteif 2007).

En estudios in vivo con ratas, la inyección intraperitoneal de ET-1 se ha comprobado que induce un aumento de la glucosa endógena y de los niveles de insulina, así como un descenso de la respuesta a la insulina (Juan 1996). En este sentido, la ET-1 administrada en humanos induce resistencia a la insulina (euglucemia-hiperinsulinemia) (Ottosson-Seeberger 1997).

La acción global de la insulina sobre el músculo esquelético depende parcialmente de la capacidad de producirse vasodilatación en respuesta a la insulina (Vincent 2003, Scherrer 1994). Con esta vasodilatación se redistribuye el flujo sanguíneo según las necesidades metabólicas. Esta acción vascular de la insulina está reducida en estados de resistencia a la insulina (Cleland 1999, Steinberg 1994). Se ha comprobado el aumento endógeno de ET-1 contribuye a la disfunción vascular en la diabetes y en la obesidad. A partir de estos estudios se postula que el antagonismo de la endotelina podría aumentar la vasodilatación

mediada por insulina y la mejorar la acción de la insulina en los tejidos periféricos.

La disfunción endotelial es un aspecto destacado de la enfermedad vascular y juega un papel importante en la micro y macroangiopatía diabética (Versari 2009). Así mismo se considera que la disfunción endotelial es un precursor en el desarrollo de la arteriosclerosis. En ratones que expresan prepro-ET-1 muestran daño endotelial y disminución de la vasodilatación en asociación con un aumento de la producción de ROS y de la inflamación vascular (Kohner 1995, Pang 1997). En modelos animales de disfunción endotelial (Barton 1998) se ha comprobado que el bloqueo de los receptores de la ET-A mejoran el daño endotelial dependiente de NO.

En los estadios iniciales, el desbalance entre el aumento de vasoconstrictores como la ET-1 y la disminución de la actividad de NO debida a estrés oxidativo de la hiperglucemia, resultan en una disminución de la relajación vascular. Esta situación crónica finalmente condiciona daño estructural, trombosis y el depósito de plaquetas en la pared vascular (Kalani 2008, Lam 2001). La ET-1 no sólo actúa como vasoconstrictor, si no que además estimula la proliferación de células musculares lisas vasculares, promueve la fibrosis y la inflamación.

Se ha sugerido que alteraciones en el sistema endotelina juegan un papel en el desarrollo de hipertensión y de daño endotelial, lo que contribuye al desarrollo de la arteriosclerosis. Además, se ha observado un aumento de la expresión de los receptores ET-A y ET-B en células de la pared vascular enferma, como son en las células musculares lisas, los macrófagos y las células espumosas (Ihling 1996, Lerman 1991).

La ET-1 y la enzima convertidora de endotelina (ECE) también se expresan en las placas humanas y los nivel de ET-1 aumentan en función de la progresión de la enfermedad arteriosclerosa (Winkles 1993, Minamino 1997). Estudios en modelos animales han demostrado regresión de las placas de ateroma con el bloqueo de los receptores de ET-1. En un estudio de Watson et al (Watson 2010), se comprobó que con el bloqueante de ET-A avosentan se producían cambios antiarteriosclerosis, asociado a reducción del estrés oxidativo y de la inflamación.

Todas estas propiedades hacen que la ET-1 se postule como uno de los factores que más importante papel juegan en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes.

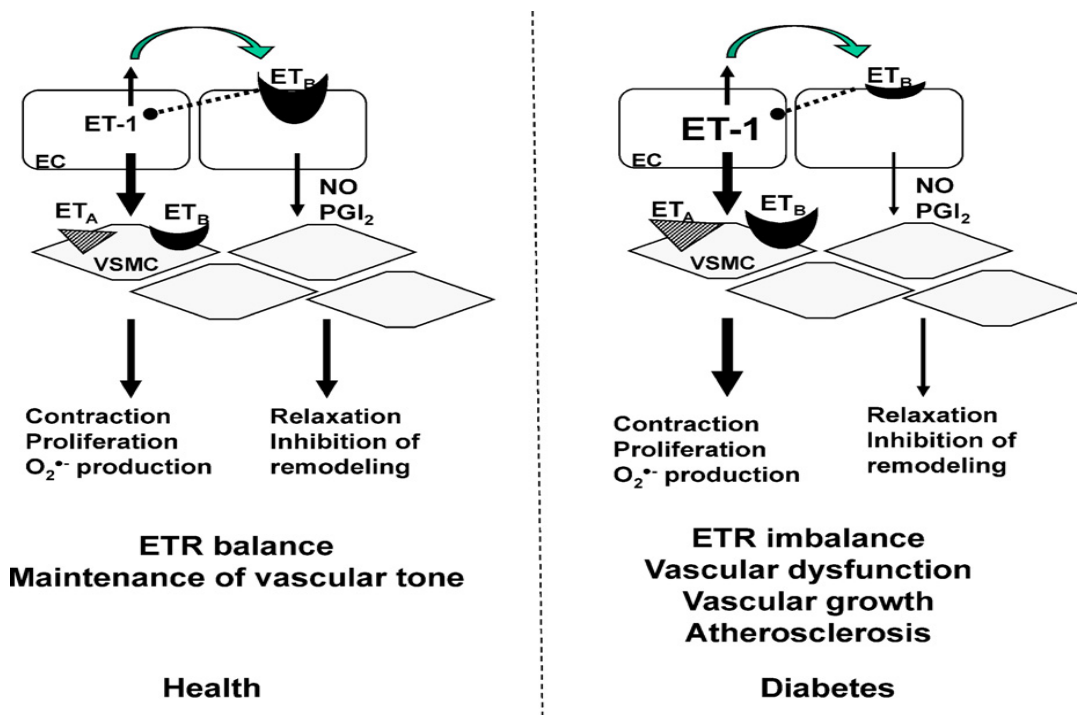


Figura 1.9. Efectos vasculares de la ET-1 en situación de normalidad y en la diabetes mellitus.

Diferentes líneas de investigación sugieren que el sistema endotelina juega un papel importante en el daño vascular que se produce en la diabetes:

- Los niveles en plasma de endotelina-1 están elevados en pacientes con diabetes tipo 1 y 2 (Collier 1992, Takahashi 1990).
- Se ha observado una correlación positiva entre los niveles de ET-1 y las complicaciones diabéticas. Los niveles de ET-1 están más elevados en los pacientes diabéticos con microalbuminuria, niveles elevados de hemoglobina glucosilada y retinopatía (Collier 1992, Kawamura 1992).
- En estados de resistencia a la insulina, existe un desbalance entre los efectos insulín-dependientes sobre el NO y la liberación de la ET-1 en el endotelio, condicionando daño endotelial. Estudios clínicos han demostrado que el bloqueo de los receptores ET-A tiene efectos beneficiosos sobre la resistencia a la insulina y a la disfunción vascular (Weil 2011).
- En humanos, los bloqueantes de los receptores de ET-A y ET-A y B reduce la tensión arterial en pacientes tipo 2 y aumenta el flujo arterial en antebrazo (Cardillo 2002).
- In vitro se ha comprobado que la hiperglucemia y la hiperinsulinemia condicionan una regulación al alza de la ET-1 (Harris 2005, Takeda 1991).
- Se ha comprobado que el antagonismo del receptor ET-A aumenta la microcirculación a nivel de la piel en pacientes con diabetes tipo 2 (Settergren 2008)
- En un estudio piloto realizado en pacientes diabéticos con isquemia crítica de los miembros inferiores, se ha demostrado que la infusión local de receptores ET-A aumentan la tensión de oxígeno en el piel, sugiriendo un aumento del flujo sanguíneo capilar (Kalani 2008).

1.6 ENDOTELINA Y ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA (EAP)

1.6.1 Papel potencial de la ET-1 en la EAP

1.6.1.1 Niveles elevados de ET-1 en pacientes con EAP

Algunas evidencias que sugieren que la ET-1 está implicada en la arteriosclerosis incluyen los niveles elevados de ET-1 en pacientes con arteriosclerosis sintomática como la cardiopatía isquémica y el ictus (Yasuda 1990, Alioglu 2002). Además, se ha comprobado que los niveles de ET-1 correlacionan positivamente con el número de sectores afectados (Lerman 1991). Con respecto a la EAP, niveles elevados de ET-1 se han observado en la arteriopatía periférica, tanto en claudicantes como en pacientes con isquemia crítica (Mangiafico 1999, de Haro 2010). Además, niveles elevados de ET-1 se han asociado con un peor pronóstico en cuanto a riesgo de mortalidad cardiovascular (Newton 2005).

1.6.1.2. Niveles elevados de ET-1 y de los receptores de endotelina en arterial humanas enfermas.

En las células musculares lisas de la media así como en el endotelio de arterias con placas de ateroma, se han encontrado niveles elevados de ET-1, de su mRNA y de los receptores de ET-1. Los receptores ET-A fueron encontrados fundamentalmente en las células musculares lisas y los ET-B en el endotelio (Dashwood 1998).

Esta misma distribución de receptores se ha comprobado en arteria femoral de pacientes con isquemia crítica (Dashwood 2010)

1.6.1.3 Papel de la ET-1 en arterias enfermas.

En estudios in-vivo se ha comprobado que la infusión de ET-1 en la arterial femoral de perros se acompaña de un aumento inicial del flujo sanguíneo, seguido de una reducción gradual posterior (Miura 2001). En humanos, la infusión de ET-1 reduce el flujo de sangre en las piernas de voluntarios sanos (Wray 2007). En sujetos de edad avanzada el antagonismo de la endotelina resultó en un mayor incremento del flujo de sangre que en sujetos más jóvenes, sugiriendo que la ET-1 juega un papel importante en el tono vascular en función de la edad (Thijssen 2007).

La activación de la ET-1 está asociada a factores de riesgo cardiovascular como hipertensión, hiperlipidemia y diabetes (Cardillo 2002). Además de actuar como un potente vasoconstrictor, la ET-1 actúa antagonizando los efectos de NO contribuyendo a la disfunción endotelial (Iglarz 2007). Dicha disfunción endotelial promueve la adhesión leucocitaria, trombosis, inflamación y proliferación celular, lo que condiciona la formación de la placa de ateroma. Una vez formadas, estas placas son una fuente de más ET-1 lo que de forma paracrina da lugar a la progresión de la enfermedad (Dashwood 2002)

1.6.2. ET-1 y daño microvascular

Además de la macroangiopatía, también en la EAP se produce una alteración en la microcirculación. Se ha demostrado en biopsias musculares de pacientes con isquemia crítica un aumento de la ET-1 y de su unión con los receptores ET-A y ET-B (Tsui 2003).

En un modelo en ratas, se ha comprobado que en un flap musculocutáneo isquémico, el bloqueo del receptor ET-B produce un incremento del flujo vascular arteriolar así como una reducción en la necrosis de dicho flap (Wettstein 1997).

En humanos, el efecto del bloqueo del receptor ET-A a nivel de la microcirculación ha sido estudiado en pacientes con diabetes tipo 2. La infusión de bloqueantes de los receptores ET-A, mejoraron la microcirculación a nivel de la piel (Settergren 2008). Este grupo demostró en pacientes con isquemia crítica no revascularizable, que la infusión de bloqueantes ET-A, se asoció a un aumento de la tensión transcutánea de oxígeno y de la presión en el pie, lo que es indicativo de una mejor perfusión tisular (Kalani 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS.

Como se ha comentado anteriormente en la introducción, la endotelina juega un papel importante en el tono vasomotor en condiciones fisiológicas a través del efecto fundamentalmente paracrino sobre los receptores ET-A y ET-B, tanto a nivel del endotelio como de las células musculares lisas de la capa media.

Sin embargo, en condiciones patológicas como en la diabetes mellitus, la endotelina parece estar involucrada en el desarrollo de la enfermedad vascular debido a una diferente expresión de los receptores ET-A y ET-B, así como a un aumento de su síntesis y liberación local, inhibiendo la acción de moléculas vasodilatadoras como el óxido nítrico. Además de actuar como un potente vasoconstrictor, la ET-1 actúa antagonizando los efectos de NO contribuyendo a la disfunción endotelial. Dicha disfunción endotelial promueve la adhesión leucocitaria, trombosis, inflamación y proliferación celular, lo que condiciona la formación de la placa de ateroma. Una vez formadas, estas placas son una fuente de más ET-1 lo que de forma paracrina da lugar a la progresión de la enfermedad. Por otra parte también es conocido que la ET-1 aumenta la resistencia a la insulina y el paso transmembrana de la glucosa, lo que podría perpetuar el efecto pernicioso de la ET-1 en la diabetes mellitus.

A partir de lo anterior por tanto cabe pensar que en los pacientes diabéticos existe un estado de “hiperactividad” de la ET-1 lo que podría condicionar un daño endotelial mediado por inflamación vascular y por estrés oxidativo. Así mismo cabría pensar que el bloqueo selectivo de los receptores de la ET-1, ET-A y ET-B, podría revertir al menos parcialmente los efectos nocivos de la diabetes mellitus en el daño vascular.

Los principales **OBJETIVOS** de la presente tesis son:

1. Analizar en pacientes diabéticos claudicantes, en pacientes diabéticos con lesiones tróficas y en controles no diabéticos:
 - el nivel de expresión de ET.
 - niveles plasmáticos metabolitos del óxido nítrico (NO).
 - la expresión de moléculas implicadas en la inflamación (IL-6, IL-10).

2. Analizar si modifica y cómo modifica el antagonista bosentán la respuesta inflamatoria y la síntesis de la molécula vasodilatadora NO, en los mismos grupos de individuos.

3. Determinar si existen diferencias en la expresión de receptores ET-A y ET-B en leucocitos, en los mismos de sujetos.

PACIENTES Y METODO

4. PACIENTES Y MÉTODO

En la presente tesis se han realizado experimentos *in vitro* con el objetivo de estudiar las diferencias en la expresión de proteínas plasmáticas en pacientes diabéticos con enfermedad arterial periférica en diferentes estadios clínicos (claudicantes y pacientes con isquemia crítica), en comparación con controles no diabéticos. También se ha estudiado la expresión de los receptores ET-A y ET-B en células mononucleares en los 3 grupos de pacientes, así como la expresión de ET-1 en células mononucleares incubadas *in vitro* por el bloqueante de los receptores ET-A y ET-B bosentan.

Además, se han analizado las posibles diferencias en el proteoma plasmático en los 3 grupos de pacientes, en una situación basal sin bosentan comparado con los plasmas incubados *in vitro* con bosentan.

4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES

Se seleccionaron 3 grupos de sujetos. En la consulta de Cirugía Vasculuar, se seleccionaron los pacientes diabéticos con claudicación intermitente. Los pacientes con isquemia crítica (dolor en reposo y/o lesiones tróficas) se seleccionaron a partir de los ingresos en el S^o de Cirugía Vasculuar. Por último, los controles no diabéticos fueron seleccionados de pacientes del S^o de Urología con patología benigna prostática y del S^o de Cirugía General portadores de hernia inguinal, con el fin de tener una muestra de controles de similar sexo y edad que los casos.

Los participantes fueron informados del estudio y firmaron un consentimiento específico.

4.2. DETERMINACIONES DE PROTEÍNAS MEDIANTE PROTEÓMICA

Para llevar a cabo este análisis se utilizó la proteómica, que es una nueva tecnología que permite analizar la expresión de múltiples proteínas a la vez en una única muestra. En un estudio proteómico es necesario integrar una serie de tecnologías, como la electroforesis bidimensional (2-DE), el análisis de la imagen, la espectrometría de masas (MS) y la bioinformática, como se muestra a continuación .

4.2.1. Electroforesis bidimensional

La 2-DE es la base fundamental para el desarrollo de los mapas de expresión proteica o proteomas. Esta técnica permite separar las proteínas en dos dimensiones: el peso molecular y el punto isoelectrónico. Esta separación bidimensional de las proteínas da lugar a un mapa de expresión proteica en el que cada proteína y sus isoformas están distribuidas en la coordenada formada por el peso molecular y el punto isoelectrónico. Esta coordenada es única para cada proteína, es decir, es el documento de identidad de la misma (Figura 4.1.).

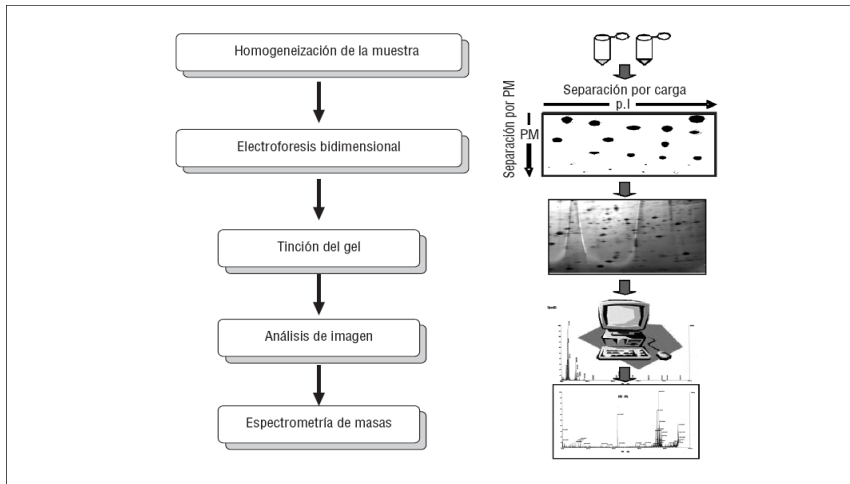


Figura 4.1. Esquema representativo de los diferentes pasos necesarios para desarrollar un estudio proteómico desde la homogeneización de la muestra, la separación de las proteínas que contiene y su identificación mediante espectrofotometría de masas. PM: Peso molecular.

4.2.1.1 *Material utilizado*

- Tampón de rehidratación
- *kit Pierce® BCA Protein Assay*
- Geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (*Bio-Rad ReadyStrip™*).
- Sistema PROTEAN® IEF *cell* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- Geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS- PAGE) al 10%
- Sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*)
- *Kit Silver Stain Plus* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- Escáner UMAX POWERLOOK III
- *Software ScanMagic V 4.5*
- Programa *Quantity One 4.2.3* (Laboratorios *Bio-Rad*)

4.2.1.2 Preparación de las muestras

Las muestras de sangre se recogen en tubos con EDTA como anticoagulante y se centrifugan a 2500 rpm durante 15 minutos. Pasado el tiempo de centrifugación, la fase roja queda en la parte inferior del tubo y el plasma queda en la parte superior. Dicho plasma es recogido cuidadosamente con una pipeta Pasteur y lo depositamos en un tubo Eppendorf. Posteriormente se procede al lisado de la muestra en una solución tampón (*rehydration buffer*) que contiene un agente desnaturalizante (urea), un detergente (CHAPS y anfólitos) y un agente reductor (ditiotreitól) en las concentraciones que se exponen a continuación (Tabla 4.1):

- Urea.....8 mol/l
- CHAPS w/v.....2%
- Ditiotreitól.....40 mmol/l
- Anfólitos Bio-Lyte (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, Cal)...0.2%
- Azul de bromofenól w/v.....0.01%

COMPONENTE	FUNCIÓN	CONCENTRACIÓN
Urea	Desnaturaliza y solubiliza las proteínas	8 M/l
Detergente (CHAPS)	Solubiliza las proteínas y ayuda a mantenerlas en solución durante la rehidratación y 2-DE	2%
Agente reductor (ditiotreitól)	Rompe los puentes disulfuro en las proteínas	40 mM
Anfolitos	Ayudan a solubilizar las proteínas y a mantener el gradiente de pH entre 0.2-2%	0.2%

Tabla 4.1. Componentes, función y concentración de la solución de rehidratación.

Posteriormente, las muestras de plasma se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se congeló a -80 °C hasta su análisis.

4.2.1.3. Primera dimensión

La concentración de proteínas se estimó utilizando el *kit Pierce® BCA Protein Assay*. Se trata de una formulación basada en el ácido bicinónico (BCA), compatible con detergentes, para la detección colorimétrica y cuantificación de las proteínas totales.

El principio del método del ácido bicinónico (BCA), patentado por *Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)*, es similar al procedimiento de *Biuret*, en

cuanto que ambos se basan en la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína bajo condiciones alcalinas, seguido de la reducción del Cu^{2+} en Cu^{1+} 251. La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente. El BCA forma un complejo azul púrpura con el Cu^{1+} por proteínas en medios alcalinos, de modo que permite monitorizar la reducción de Cu^{2+} por las proteínas a un máximo de absorbancia de 562 nm y de este modo cuantificar las proteínas. La estructura macromolecular de la proteína, el número de uniones peptídicas y la presencia de cuatro aminoácidos en particular (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) han sido descritos como los responsables de la formación de color con BCA. La concentración de proteínas se determina en referencia generalmente a una proteína estándar común, como la albúmina bovina.

El ensayo BCA es más sensible y aplicable que los métodos de *Biuret* o de *Lowry*. Además, tiene menos variabilidad que el método de *Bradford*. Entre otras características del ensayo BCA encontramos:

- Método colorimétrico, se lee a 562 nm.
- Compatible con la mayoría de los detergentes iónicos y no iónicos.
- Más rápido y fácil que el método de *Lowry*.
- Todos los reactantes son estables a temperatura ambiente durante 2 años.
- El rango de trabajo varía de 20 a 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- El complejo de color es estable.
- Adaptable a microplacas.
- Menor variación proteína-a-proteína que con los métodos de tinción.
- Es aplicable a un amplio rango de concentraciones de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó con referencia al estándar, la albúmina bovina (Fig. 4.2).

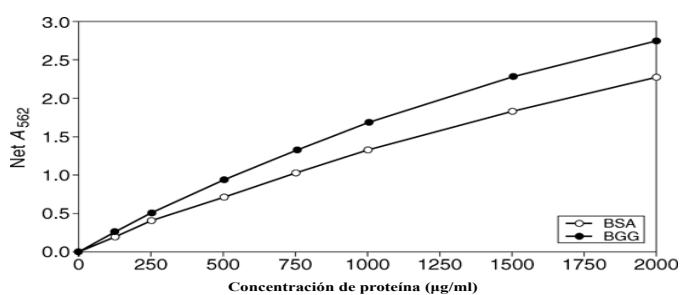


Figura 4.2. Ejemplo de curva de comparación de concentración de proteínas frente a la albúmina bovina. **BSA:** albúmina de suero bovino. **BGG:** gammaglobulina bovina. Fuente: internet.

La cuantificación de las proteínas se realizó siguiendo los pasos que se indican a continuación:

1. Preparación de las diluciones estándar de BSA (albúmina de suero bovino). Las diluciones de BSA se prepararon a partir de ampollas de BSA de 2.0 mg/ml, según el siguiente esquema (Tabla 4.2):

VIAL	VOLUMEN DE DISOLVENTE	VOLUMEN/FUENTE DE BSA	CONCENTRACIÓN FINAL BSA
A	700 µl	100 µl del estándar	250 µg/ml
B	400 µl	400 µl del vial A	125 µg/ml
C	450 µl	300 µl del vial B	50 µg/ml
D	400 µl	400 µl del vial C	25 µg/ml
E	400 µl	100 µl del vial D	5 µg/ml
F	400 µl	0	0 µg/ml (blanco)

Tabla 4.2. Diluciones de BSA indicando el volumen de disolvente, la relación volumen/fuente de BSA y la concentración final de BSA. BSA: albúmina de suero bovino.

2. Preparación del reactivo de trabajo BCA

Se empleó como reactivo el *kit Pierce® BCA Protein Assay*. Para determinar el volumen total de reactivo de trabajo se empleó la siguiente fórmula: $(x \text{ estándar} + x \text{ muestras problema}) \times (\text{no duplicados}) \times (\text{volumen de reactivo de trabajo por muestras} = 200 \mu\text{l}) = \text{volumen total}$. El reactivo de trabajo se prepara mezclando 50 partes de reactivo A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicinínico y tartrato sódico en hidróxido sódico 0.1 M) con una parte de reagente B (sulfato cúprico 4%).

- Se pipetearon 25 μl de cada estándar o muestra problema por triplicado en pocillos
- Se añadieron 200 μl de reactivo de trabajo a cada pocillo y se mezcló la placa en un agitador durante 30 segundos.
- Se tapó la placa y se incubó a 37 °C durante 30 minutos
- Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente
- Se midió la absorbancia a 562 nm
- Se restó la absorbancia de la muestra blanco al resto de muestras
- Se preparó la curva estándar: en el eje de ordenadas la medida de absorbancia; en el eje de abscisas, la concentración conocida de BSA. A continuación, en esta curva se interpolan los valores obtenidos en el resto de muestras problema.

Para la primera dimensión de la 2-DE se cargaron muestras de 250 μg de proteína total en tiras de geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con un pH de 3 a 10 (*Bio-Rad ReadyStrip*TM). El foco isoeléctrico se realizó con el sistema PROTEAN® IEF *cell* (Laboratorios *Bio-Rad*) durante tres días y a temperatura ambiente (20 °C). Este sistema está diseñado para llevar a cabo la primera dimensión y consiste en una fuente de alimentación programable con una plataforma *Peltier* que mantiene la temperatura constante para asegurar la reproducibilidad. Dicho sistema permite acomodar 12 tiras de 17 cm para realizar el foco isoeléctrico. Puede ser programado completamente para una rehidratación pasiva o activa (50 V). Las especificaciones técnicas se listan en la Tabla 4.3.

RENDIMIENTO	
Voltaje	50-10000 V, incrementos de 10 V
Corriente	0-2.4 mA, incrementos de 1.0 μA
Potencia	0-24 W
PLATAFORMA <i>Peltier</i>	
Capacidad	24 tiras de 7 cm o 12 toras de 11,17,18 o 24 cm.
Temperatura de operación	10-25 °C
Dimensiones	28 x 30 x 14 cm

Tabla 4.3. Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® IEF *cell* (Laboratorios *Bio-Rad*).

Como se ha publicado con anterioridad los geles fueron rehidratados activamente a 50 V durante 60 horas, seguido de rápidas subidas lineales de tensión y voltaje, limitados por una corriente máxima de 50 μA por gel²⁵².

4.2.1.4. Segunda dimensión

En la segunda dimensión las proteínas de las tiras se separaron según su peso molecular en geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico al 10% (SDS-PAGE) utilizando el sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*). Esta unidad proporciona una gran área de separación de las proteínas, lo que permite analizar muestras con mayor carga y, finalmente, también obtener una mejor resolución respecto a los formatos de gel más pequeños. Las especificaciones técnicas se incluyen en la Tabla 4.4.

SISTEMA PROTEAN® II XL	
Número de geles	1-4
Tamaño del gel	18.3 x 20 cm (altura x longitud)
TAMAÑO del PLATO	
Interno	20 x 20 cm
Externo	20 x 22.3 cm
Longitud del espaciador	22.3 cm
Volumen superior de tampón	350 ml
Volumen inferior de tampón	1.2 L
TIEMPOS para el SDS-PAGE	
Sin enfriamiento	5 h
Con enfriamiento	3.5 h

Tabla 4.4. Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*).

4.2.1.5. Tinción

Posteriormente, los geles fueron fijados en una solución con etanol y ácido acético en agua destilada durante 20 minutos. Después se utilizó una solución de sensibilización compuesta por acetato sódico y tiosulfato sódico en agua destilada y se lavaron dos veces de 10 minutos con agua destilada. Entonces los geles fueron teñidos con plata utilizando el kit *Silver Stain Plus* (Laboratorios *Bio-Rad*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, durante 25 minutos.

El *Silver Stain Plus* es un sistema rápido y sencillo para detectar proteínas en los geles de poliacrilamida tras la electroforesis. Esta tinción con plata es muy sensible, pudiendo detectar incluso cantidades de nanogramos de proteínas. El *kit Silver Stain Plus* contiene los siguientes componentes:

- Concentrado potenciador del fijador
- Solución de complejo de plata, que contiene NH_4NO_3 y AgNO_3
- Ácido tungstosilícico, compuesto por silicio y tungsteno ($\text{H}_4[\text{Si}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$) y que a 20 °C es completamente soluble
- Formaldehído
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) como agente acelerador de la tinción

Para la correcta tinción de los geles los contenedores se limpiaron con 50% de ácido nítrico después del detergente de laboratorio. Además, las superficies de los geles estuvieron completamente sumergidas y se evitaron temperaturas superiores a 25 °C. Los geles teñidos se lavaron dos veces con agua destilada durante 5 minutos cada vez. Es muy importante destacar que la tinción con plata utilizada fue compatible con posteriores pasos de MS. El siguiente paso fueron dos lavados con agua destilada de un minuto de duración cada uno para

seguidamente aplicar la solución de revelado compuesta de carbonato sódico y formaldehído en agua destilada. Una vez que los geles alcanzaron el grado de tinción deseado se paró el proceso mediante el empleo de una solución con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en agua destilada.

4.2.2 Adquisición de imágenes y análisis

Los geles teñidos fueron escaneados utilizando un escáner UMAX POWERLOOK III operado por el software *ScanMagic V 4.5*. El análisis de la imagen se realizó utilizando el programa *Quantity One 4.2.3* (Laboratorios *Bio-Rad*) (Fig. 4.3). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas. A la intensidad del volumen de cada punto le fue sustraída la intensidad correspondiente al fondo.

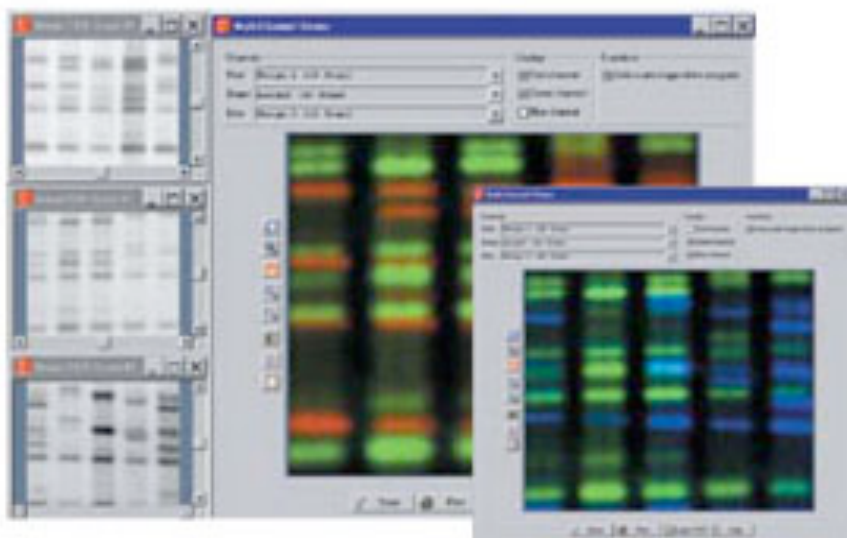


Figura 4.3. Ejemplo de pantalla de análisis con el programa *Quantity One*.

La identidad de cada punto se realizó por comparación con la base de datos *Swiss Prot* (ExpASY). La densidad de los puntos estudiados más importantes se confirmó con MS.

En el mapa proteómico del plasma se analizaron densitométricamente y se fueron identificados. Los *spots* en los que se observaron diferencias significativas se identificaron con MS.

4.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La EM es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares proteicas.

4.3.1. Material utilizado

- Agua *Milli-Q™* (*Merk Millipore*)
- Acetonitrilo (CH₃CN) al 100%
- Sistema *SpeedVac®* (*Thermo Scientific*)
- Ditioeritritol (C₄H₁₀O₂S₂)
- Bicarbonato amónico (NH₄HCO₃)
- Iodoacetamida (C₂H₄INO)
- Tripsina (*Promega®*)
- Ácido trifluoroacético (TFA, CF₃COOH)
- Puntas mmol-18 *Zip* (*Millipore*)
- Matriz de α-ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*)

- Placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*)
- 4700 *Proteomic Analyzer* (*Applied Biosystem*)
- Calibradores estándar (*Applied Biosystem*)

4.3.2. Método

Para la identificación de las proteínas de interés, los puntos se extrajeron manualmente de los geles utilizando un punzón para biopsias. La identificación de cada proteína se llevó a cabo extrayendo el mismo punto de interés en tres geles diferentes. La tinción de plata fue solubilizada y eliminada y los puntos fueron lavados tres veces con agua *Milli-Q™* (*Merk Millipore*). Para esta técnica se recomienda usar agua ultrapura, teniendo las siguientes características: un nivel de resistividad de 18,2 MegaOhmios.cm a 25 °C y un nivel de carbonato orgánico total inferior a 10 ppb. Los sistemas *Milli-Q™* constan de varias etapas de purificación, cada una de ellas diseñada para eliminar una determinada gama de contaminantes. Se utilizó el módulo Gradient A10 (Tabla 4.5).

ESPECIFICACIONES	
Resistividad (MΩ.cm) a 25 °C	18.2
Nivel de COT (valores típicos)	1-5
Nivel de pirógenos (Eu/ml)	NE
Bacterias (UFC/ml)	<1
Partículas > 0.22 μm (P/ml)	<1
Caudal (L/min)	1.5

Tabla 4.5. Especificaciones del agua producida por el sistema *Milli-*

Q™ Gradient A10.

Después las muestras se incubaron con acetonitrilo (CH₃CN), utilizado como disolvente, al 100% durante 5 minutos y otros 30 minutos con ácido trifluoroacético (TFA, del inglés *TriFluoroAcetic acid*, con la fórmula CF₃COOH) al 5% y acetonitrilo al 50% y se secaron con un sistema *SpeedVac (Thermo Scientific)*.

Como se ha publicado previamente, las muestras se redujeron con ditioeritritol (C₄H₁₀O₂S₂) en bicarbonato amónico (NH₄HCO₃) y posteriormente fueron alquiladas con iodoacetamida (C₂H₄INO), un inhibidor irreversible de todas las cisteína peptidasas (mediante el mecanismo de alquilación de los residuos catalíticos de la cisteína), en bicarbonato amónico. Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12.5 ng/μl de tripsina (*Promega®*) en 25 mM de bicarbonato de amonio (pH 8.5) a 37 °C durante toda la noche.

La tripsina utilizada es una enzima peptidasa de origen porcino, modificada mediante metilación, que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los residuos lisina (Lys) y arginina (Arg). Su actividad máxima se establece a un pH entre 7 y 9 y se inactiva de forma reversible a un pH de 4.

Tras la digestión, los péptidos se extrajeron del gel mediante una solución de 100 mmol/l de bicarbonato amónico. Estos extractos se liofilizaron y resuspendieron en TFA al 0.1%. Los péptidos se purificaron usando puntas mmol-18 Zip (*Millipore*).

Para la EM se mezcló 1 μ l de los extractos purificados con 1 μ l de matriz de α -ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*) en acetonitrilo al 50%. Un microlitro de esta mezcla se cargó en una placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*, del inglés *Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente.

Los espectrómetros de masas utilizados en el análisis de proteínas o péptidos pueden ser divididos básicamente en dos partes: la fuente de iones y el detector. La fuente de ionización MALDI se asocia a un analizador de tiempo de vuelo (TOF-*Time of Flight*) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ion padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

La EM se realizó utilizando el aparato 4700 *Proteomic Analyzer (Applied Biosystem)* y el análisis se efectuó en modo reflector positivo. Todos los espectros de masas se calibraron usando una mezcla de calibradores estándar (*Applied Biosystem*). Con el análisis en modo MS obtuvimos un espectro de masas denominado "huella peptídica" (Fig. 4.4), y algunos de los péptidos observados se analizaron en modo MS/MS, como se ha publicado anteriormente. El modo MS/MS obtiene espectros de fragmentación de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. Los péptidos

con una relación señal-ruido mayor de 20 se consideraron en la base de datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) para la identificación de la proteína.

Para llevar a cabo dicha identificación se utilizó la base de datos *Mascot* 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) como algoritmo para comparar los péptidos obtenidos por MS.

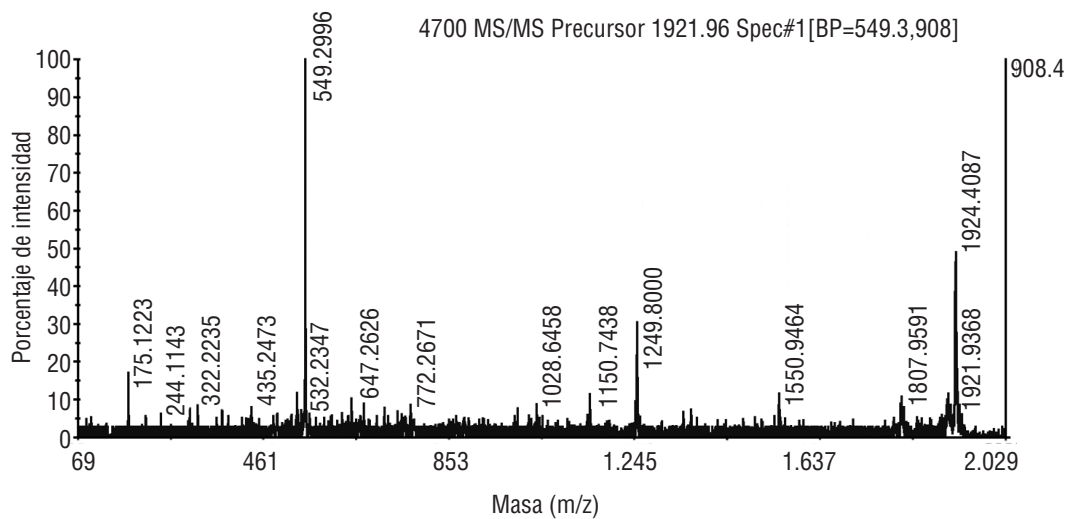


Figura 4.4. Ejemplo de un espectro de masas obtenido mediante el análisis por espectrometría de masas en tándem. El eje de las ordenadas viene definido por la relación masa/carga de cada uno de los péptidos y por el porcentaje de intensidad, que indica la cantidad relativa de iones que poseen esta relación carga/masa.

La base de datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) es una potente máquina de búsqueda para identificar proteínas de bases de datos primarias. Nos permitió integrar todos los métodos de búsqueda probados: la huella peptídica o los fragmentos derivados del modo MS/MS.

Tras analizar la mezcla de péptidos mediante MS obtuvimos un conjunto de valores de masas moleculares que cruzamos con la base de datos *Mascot*. Para cada entrada en la base de datos de proteínas la máquina simula la rotura de los enlaces específica de la tripsina utilizada en la digestión de las proteínas, calcula las masas de los péptidos previstos y compara el conjunto de valores de masas calculadas con los obtenidos de forma experimental. Para realizar la búsqueda se introdujo el espectro y después de un corto período de tiempo se recibieron los resultados.

4.4. WESTERN BLOT. DOT BLOT

Se analizó mediante Western blot (WB) la expresión de receptores ET-A y ET-B y la expresión plasmática de ET-1 mediante dot blot, como se detalla a continuación.

El WB es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada, como puede ser una mezcla compleja de proteínas (un extracto tisular). Mediante la electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al peso molecular. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas. La técnica dot blot es similar a la WB excepto por el hecho de que las proteínas se identifican

mediante complejos antígeno-anticuerpo con quimioluminiscencia sin haber separado previamente las proteínas mediante electroforesis.

4.4.1. Material empleado

- Papel de filtro
- Tampón Laemmli (1x)
- SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfato PolyAcrylamide Gel Eletrophoresis) al 15%
- PBS para lavado
- Ácido bicinonínico (BCA)
- Azul de Coomasie
- Membrana de nitrocelulosa de polifluoruro de vinilideno (PVDF)
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Tampón TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween 20)
- Anticuerpos primarios
- Anticuerpos secundarios
- Kit ECL plus (Amersham, cod. RPN 2132)
- Marcadores de peso molecular (Sigma®-Aldrich, St Louis, MI, USA)

4.4.2. Preparación de las muestras

Los tejidos homogeneizados se solubilizaron en el tampón *Laemmli*, que contiene 2- mercaptoetanol. El tampón *Laemmli* está especialmente formulado para la preparación de muestras proteicas en los geles de poliacrilamida. La

formulación de dicho tampón es la siguiente, con un pH de 6.8, aproximadamente:

- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*).....4%
- Glicerol.....20%
- 2-mercaptoetanol.....10%
- Azul de bromofenol.....0.004%
- M Tris-HCl.....125 mM

El agente detergente SDS dota a todas las proteínas de carga positiva en un intervalo regular, confiriendo a cada proteína la misma carga negativa total. De esta manera podemos separar las proteínas por su tamaño y no por su carga. El SDS también desnatura las proteínas y sus subunidades para ayudar a la separación en base al tamaño y no a la forma. Al añadir glicerol en el tampón se incrementa la densidad, consiguiendo que la muestra descienda hasta el fondo y minimizando, por tanto, pérdidas de proteína en el tampón. El 2-mercaptoetanol se utiliza para reducir los enlaces disulfuro intra e intermoleculares y permitir una adecuada separación no por forma sino por tamaño. A su vez, el azul de bromofenol sirve como indicador de la muestra de proteínas, haciendo más fácil su visualización. El *Tris*, es un componente habitual de los tampones y representa la abreviación del compuesto orgánico conocido como tris (hidroximetil) aminometano, con la fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Posee una constante de disociación (pK_a) de 8.07 a 25°C , lo que implica que dicho tampón va a tener una gran efectividad para mantener

un determinado rango de pH y así simularemos las condiciones fisiológicas del cuerpo humano.

4.4.3. Electroforesis en gel

Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida o SDS-PAGE al 15% (w/v). En cada pocillo se cargó la misma cantidad de proteína (20 µg/pocillo), calculado mediante la reacción colorimétrica basada en la reacción del BCA (*Pierce*) (Véase apartado 4.2.1.3 Primera dimensión). Para asegurarnos de que cargábamos la misma cantidad de proteínas en el gel, se elaboró otro gel paralelo con muestras idénticas que posteriormente se tiñó con azul de *Coomassie* (colorante derivado del fenilmetano, C₄₇H₄₉N₃NaO₇S₂). La solución de tinción contenía los siguientes componentes:

- Azul de *Coomassie*.....0.5 g
- Metanol.....250 ml
- Ácido acético.....50 ml
- Agua destilada hasta 500 ml.

Tras dos horas en contacto con la solución se procedió a desteñir la membrana con ácido acético y metanol.

Transferencia y bloqueo de las proteínas

La transferencia de proteínas o *blotting* consiste en la inmovilización de dichas proteínas sobre membranas sintéticas para, a continuación, detectarlas mediante sistemas de tinción. En la técnica WB, después de la separación

mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel.

Cualquier procedimiento de *blotting* consta de 5 etapas:

1. Inmovilización de las proteínas sobre la membrana mediante transferencia electroforética.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados con BSA, para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
3. Incubación del *blot* con anticuerpos primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del *blot* con anticuerpos secundarios, que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Incubación con los sustratos apropiados en aquellas bandas de proteínas marcadas con enzimas para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

El trabajo con proteínas fijadas sobre una membrana, en lugar de gel, tiene una serie de ventajas: son más rápidas de teñir y desteñir, se detectan cantidades menores de proteínas (pues se concentran en la superficie) y no se diluyen en todo el espesor del gel. Además, las membranas son más fáciles de manipular que el propio gel.

Las proteínas fueron transferidas por electrotransferencia semihúmeda desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Immobilion-P®, Millipore), para lo que se utilizó un tampón de transferencia (250 mM de

glicina, 15% de metanol, 25 mM de Tris y agua destilada). Las membranas de tipo Immobilon®-P presentan una gran adsorción a las proteínas, por lo que se evita la pérdida de las mismas durante la transferencia. Su estructura es de poro abierto, lo que facilita el acceso a las proteínas unidas o eliminar las que no lo han hecho. Los poros tienen un diámetro de 0.45 μm , por lo que pueden utilizarse en la mayoría de los WB, especialmente para proteínas de > 20 kD (Fig. 4.5). Se sometieron a 20 V durante una hora. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con metanol seguido de un tampón neutro (PBS), depositándose sobre el papel de filtro.

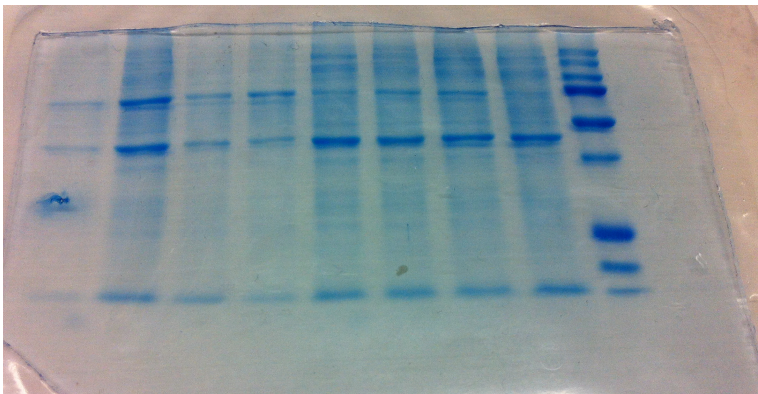


Figura 4.5. Imagen de una membrana de nitrocelulosa (*Immobilon-P®*, *Millipore*).

Dado que la membrana necesita poder unirse a proteínas de forma inespecífica, dichas membranas fueron bloqueadas (se bloquearon los lugares de unión que quedaron libres tras la transferencia) durante toda la noche a 4 °C con un 5% (w/v) con BSA. En caso contrario, los anticuerpos empleados en la detección, de naturaleza proteica, podrían unirse a ellos dificultando la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se forma con la proteína que se busca.

Detección de proteínas

Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 12 horas a 4°C (o 2 horas a temperatura ambiente) con anticuerpos monoclonales específicos unidos a una enzima que, en presencia de su sustrato, catalizó una reacción colorimétrica, haciendo patente la unión con el antígeno (la proteína) y su localización.

Las membranas se lavaron con PBS al 0.5% de *Tween* (tres veces durante 5 minutos) para eliminar el anticuerpo primario no unido y, después, fueron incubadas con anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente, que reconocían de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. (Fig. 4.6).

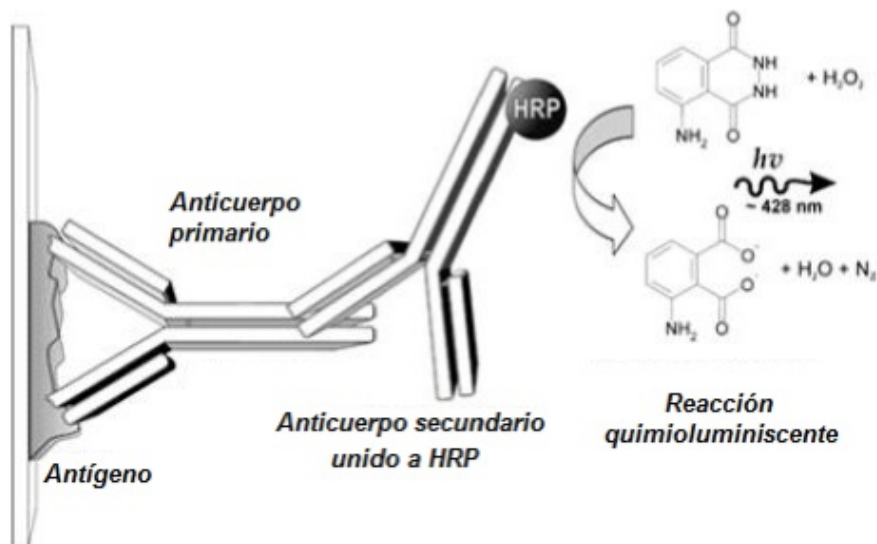


Figura 4.6. Detección de proteínas mediante la técnica *Western Blot*. **HRP:** peroxidasa de rábano.

Análisis

Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia mejorada y se evaluaron por densitometría. Para la detección de proteínas por quimioluminiscencia se utilizó el sistema ECL® (Amersham Biosciences), previo lavado con PBS. Consiste en un sustrato Lumigen® PS-3 que es convertido en un éster de acridinio cuando es catalizado por la peroxidasa de rábano. El éster reacciona con el peróxido en condiciones alcalinas y emite luz. El kit incluye la Solución A (sustrato que contiene el tampón Tris) y la Solución B (sustrato del acridinio con dioxano y etanol). Las dos soluciones se mezclan en una proporción 40:1 (Fig. 4.7).

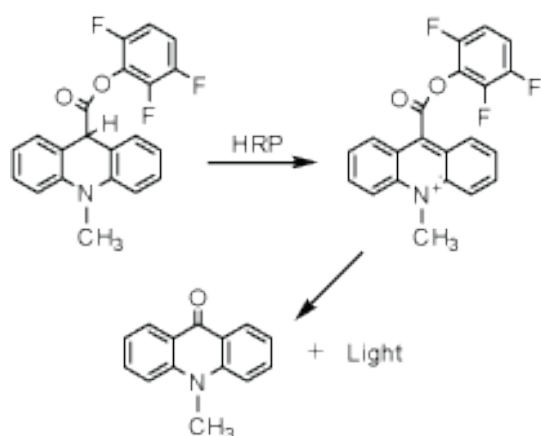


Figura 4.7. Esquema del proceso químico de la quimioluminiscencia.

Inmediatamente después de la oxidación se leyó a 428 nm, con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción.

Para la quimioluminiscencia se requirió la incubación de las membranas con el sustrato (ECL o luminol), para la posterior emisión de luminiscencia al ser expuesto al *reporter* que trae unido el anticuerpo secundario. La luz emitida fue captada por una cámara CCD, que tomó una imagen digital del WB.

La imagen se analizó por densitometría para evaluar la cantidad relativa de mancha y cuantificar el resultado en términos de densidad óptica (*Quantity One*®, Laboratorios *Bio-Rad*). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas.

Se utilizaron marcadores de peso molecular (*Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA*) para el cálculo de la masa molecular, para monitorizar el progreso en la electroforesis y como control positivo para el análisis. Existe una gran variedad de marcadores de peso molecular para numerosas proteínas.

4.4. ELISA.

ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, 'Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas') es una técnica de inmunoensayo en cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. En el presente estudio se ha empleado para determinar los niveles plasmáticos de interleukinas.

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA

disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda; son la que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados.

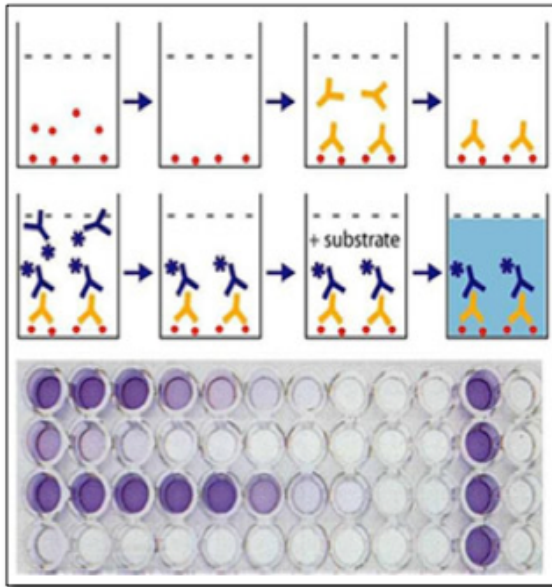


Figura 4.8. Técnica de ELISA y microplaca de pocillos con identificación de la proteína problema.

Las cuatro fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

- **Conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima** (peroxidasa, fosfatasa alcalina...). El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno. Dicha unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima ha de producirse durante un determinado período de tiempo en aras de producir una solución coloreada y que pueda ser valorada visualmente o cuantificada por medio de un espectrofotómetro

(normalmente a una longitud de onda de 414 nm).

- **Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos.** La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas. Así, el procedimiento de recubrimiento de los pocillos debe realizarse cuidadosamente. Si se usa mucho antígeno, se pueden obtener falsos positivos. Por el contrario, si se usa poco antígeno, el exceso dará lugar a una reacción falsa negativa.
- **Formación de una o más capas de inmunocomplejos.** En el caso del antígeno unido a la placa, se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti-primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa, se incuba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno. En esta etapa es muy importante controlar los factores tiempo y temperatura de incubación para evitar la aparición de falsos negativos. En el caso del tiempo, si es inferior a 15 minutos, no ocurrirá la interacción antígeno-anticuerpo y el color no será evidente al final del ensayo, dando un falso negativo. Por su parte, si la temperatura de incubación es muy baja, la formación del complejo antígeno-anticuerpo tampoco se completará en el tiempo establecido, mientras que si es muy alta, las proteínas (antígeno y anticuerpo) se desnaturalizan y, por tanto, disminuyen su capacidad para

interaccionar, dando igualmente falsos negativos.

Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría.

4.5. KIT DE NITRATOS-NITRITOS.

La capacidad de liberación de óxido nítrico se ha realizado mediante kits de Nitratos-Nitritos. La medida directa del NO es difícil debido a las propiedades químicas reactivas y a su corta vida media.

La concentración de óxido nítrico fue medida indirectamente a través de la concentración de nitritos (un producto de la degradación del NO). Ésta fue determinada con el kit de ensayo colorimétrico de Griess, reactivo no enzimático para óxido nítrico de Oxford Biomedical Research que utiliza el cadmio (Cd) para la conversión de nitrato en nitrito.

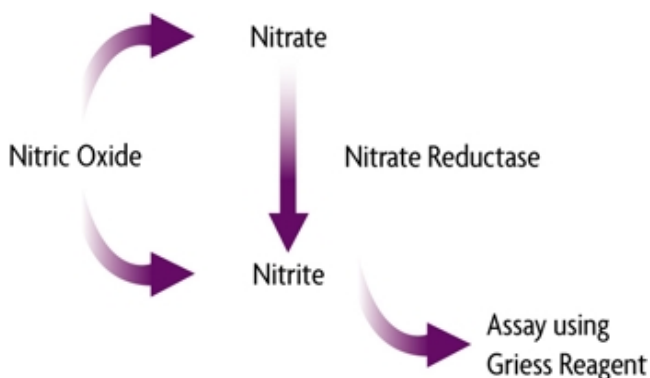


Figura 4.9. Determinación indirecta de NO.

5. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los datos densitométricos, tanto proteómicos como de los WB, se expresaron en unidades arbitrarias de densitometría (UAD), que son valores relativos de una unidad de medida mostrando el ratio de una determinada cantidad de sustancia, intensidad u otras cantidades respecto a un valor de referencia. El valor de referencia se establece en el laboratorio y sirve como referencia a múltiples medidas realizadas en un entorno similar. Dado que las UAD expresan el ratio entre una medida y la referencia, son cantidades adimensionales.

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS versión 20.0 (SPSS Inc., CA, USA). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

Los test estadísticos empleados han sido el test de Wilcoxon cuando se han analizado variables cuantitativas en grupos relacionadas, el test de Kruskal-Wallis para analizar variables cuantitativas en grupos de más de dos categorías, el test de Chi-cuadrado cuando las variables analizadas han sido cualitativas.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

Se han incluido un total de 45 sujetos, 15 en cada grupo de controles no diabéticos, 15 en el grupo de diabéticos con claudicación intermitente y 15 en el grupo de pacientes que presentaron lesiones tróficas.

6.1 Características demográficas.

Las *características demográficas* se recogen en las tablas 6.1 Y 6.2.

%	G1 (n:15)	G2 (n:15)	G3 (n:15)	<i>p</i>
Sexo varón	100	73	76	0.09
Tabaco	40	100	80	0.001
DM	0	100	100	0.000
HTA	33	86,4	88,3	0.004
Estatinas	11,4	100	76	0.000
ARA II/IECA	22,3	40	35	0.66

Tabla 6.1. Características demográficas. Variables cualitativas.

Mediana-rango	G1(n:15)	G2 (n:15)	G3 (n:15)	<i>p</i>
Edad	71(59-83)	65 (59-78)	73 (57-88)	0.11
Glucosa	96 (79-128)	140 (116-228)	123 (104-168)	0.13
col-Total	157 (110-298)	184 (164-215)	149 (120-167)	0.07
col-HDL	44 (39-57)	55 (42-68)	38 (30-49)	0.004
col-LDL	86 (78-102)	108 (99-157)	72 (59-90)	0.01
PCR	0,6 (0,4-1,2)	3,8 (1,3-5,2)	5,3 (2,2-7,8)	0.018

Tabla 6.2. Características demográficas (II). Variables cuantitativas.

Aunque no se han observado diferencias significativas en edad y sexo entre controles y los grupos de pacientes claudicantes y con lesiones tróficas, sí se han observado una mayor frecuencia de factores de riesgo cardiovascular en los grupos G2 y G3. La hipertensión arterial, el tabaquismo y la hipercolesterolemia han sido más prevalentes en los dos grupos de pacientes con enfermedad arterial periférica. No se han observado diferencia en la prevalencia de dichos factores de riesgo entre los grupos de claudicantes y de lesiones tróficas.

El grupo de claudicantes ha presentado los niveles elevados de colesterol y ha sido así mismo el que ha presentado un mayor consumo de estatinas, mientras que sólo el 11,4% del grupo control recibía tratamiento con estatinas, alcanzando la diferencias la significación estadística.

Se ha determinado la PCR como marcador inflamatorio, comprobándose que ha sido mayor cuanto más avanzada se encontraba la enfermedad y a su vez, en

ambos grupos de pacientes con enfermedad arterial periférica con respecto al grupo control, alcanzando también la significación estadística.

6.2. Niveles de ET-1, IL-6, IL-10:

Se ha observado un mayor nivel de ET-1 en los pacientes claudicantes que en el grupo control, presentando los niveles más altos el grupo de lesiones tróficas (G1: 172,9 u.a., G2: 277,1 u.a. y G3: 367,3 u.a., $p:0,01$). Figura 6.1.

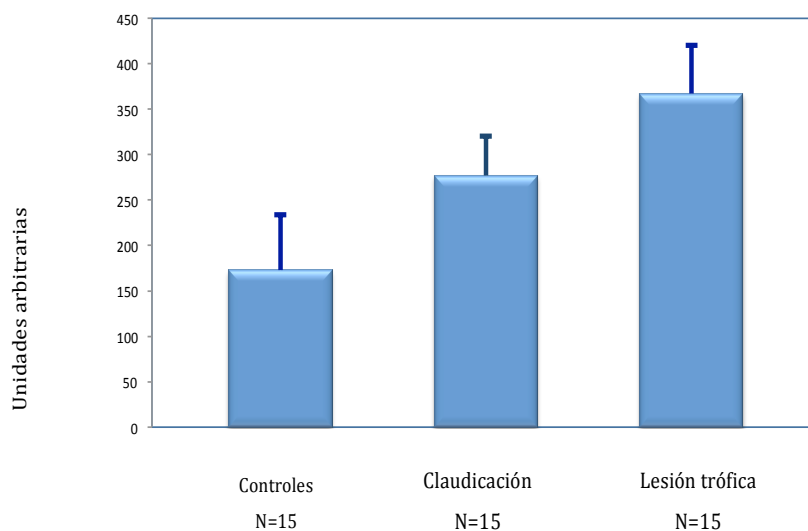


Figura 6.1. Niveles de ET-1

También se han comprobado diferencias significativas en los niveles de la interleukina proinflamatoria IL-6 (G1: 45,8 pg/ml, G2: 16,4 pg/ml y G3: 9,8 pg/ml, $p:0,02$) pero no en los niveles de la interleukina antiinflamatoria IL-10 (G1: 447,6 pg/ml, G2: 428,8 pg/ml y G3: 326,8 pg/ml, $p: NS$). Figura 6.2. y 6.3

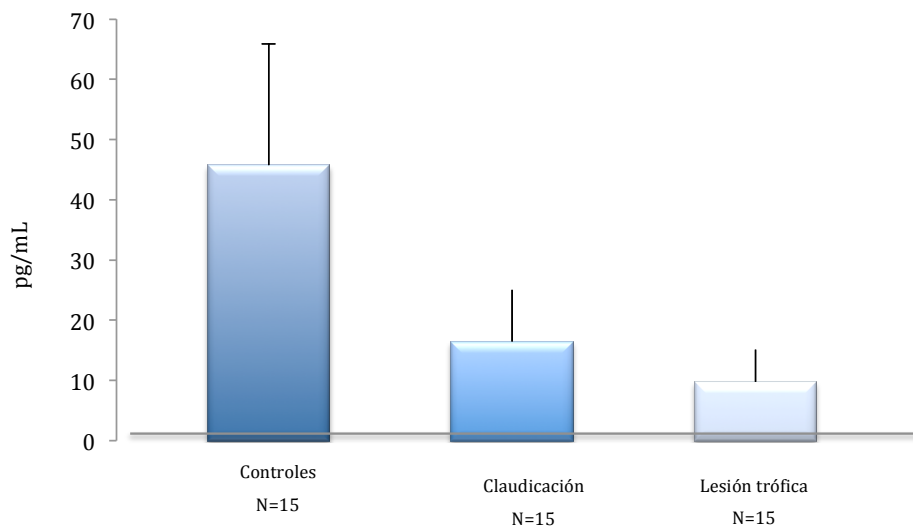


Figura 6.2. Niveles de IL-6

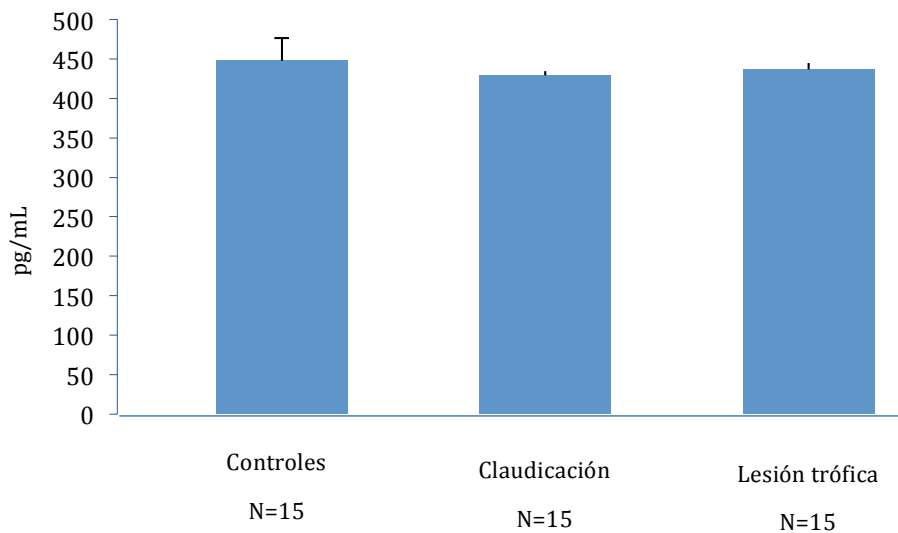


Figura 6.3. Niveles de IL-10

La administración de bosentán ha reducido la respuesta inflamatoria mediada por IL-6 en el grupo control, efecto contrario al observado en el grupo lesiones tróficas en el que ha aumentado la capacidad de liberación de IL-6 (figura 6.4). La

IL-10 no ha variado en ninguno de los grupos de tratamiento tras la administración de bosentán (figura 6.5).

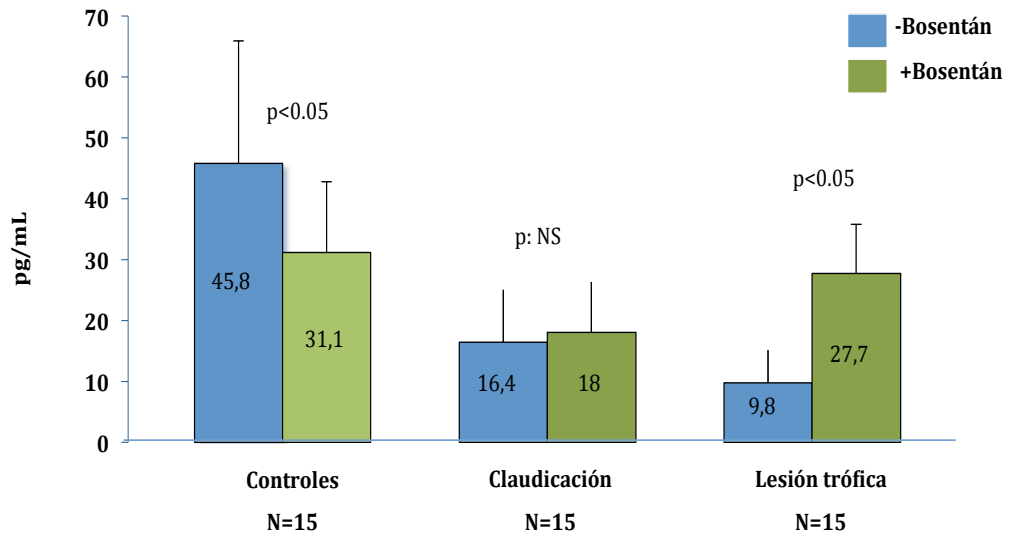


Figura 6.4. Niveles de IL-6 tras administración de Bosentán.

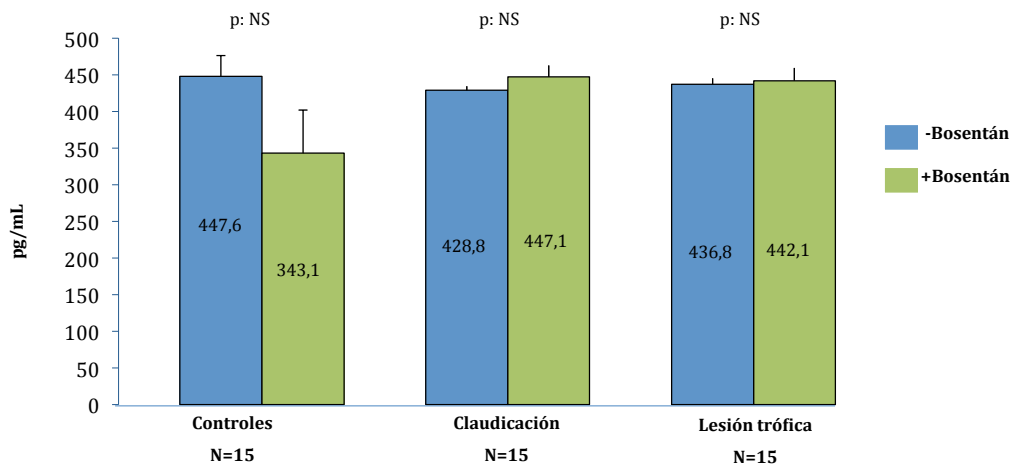


Figura 6.5. Niveles de IL-10 tras administración de Bosentán

6.3. Liberación de óxido nítrico (NO):

La capacidad de liberación de NO se ha comprobado que estaba reducida de forma basal en el grupo de lesiones tróficas con respecto al grupo control. En ambos grupos la administración de bosentán ha aumentado la capacidad de síntesis y liberación de NO de forma que el grupo de lesiones tróficas tras la administración de bosentán presenta los mismos niveles de NO que el grupo control de forma basal (figura 6.5).

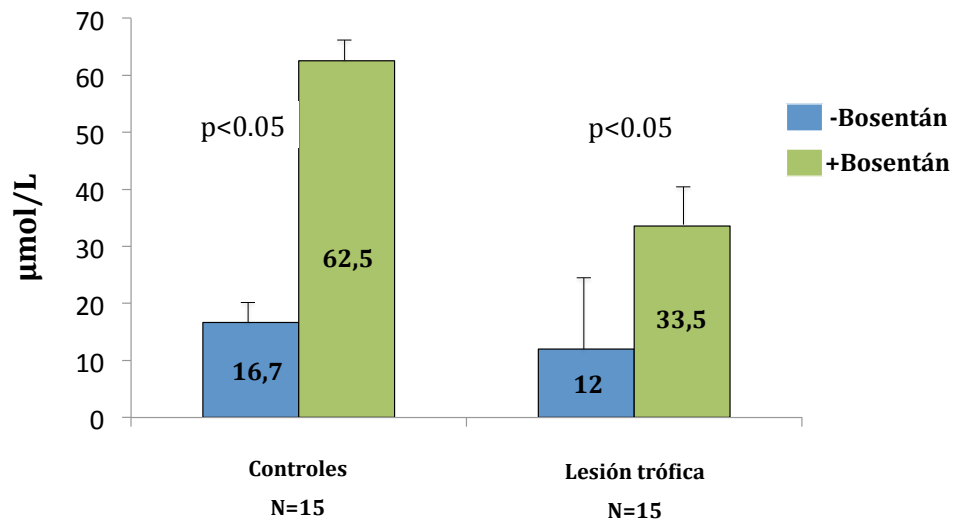
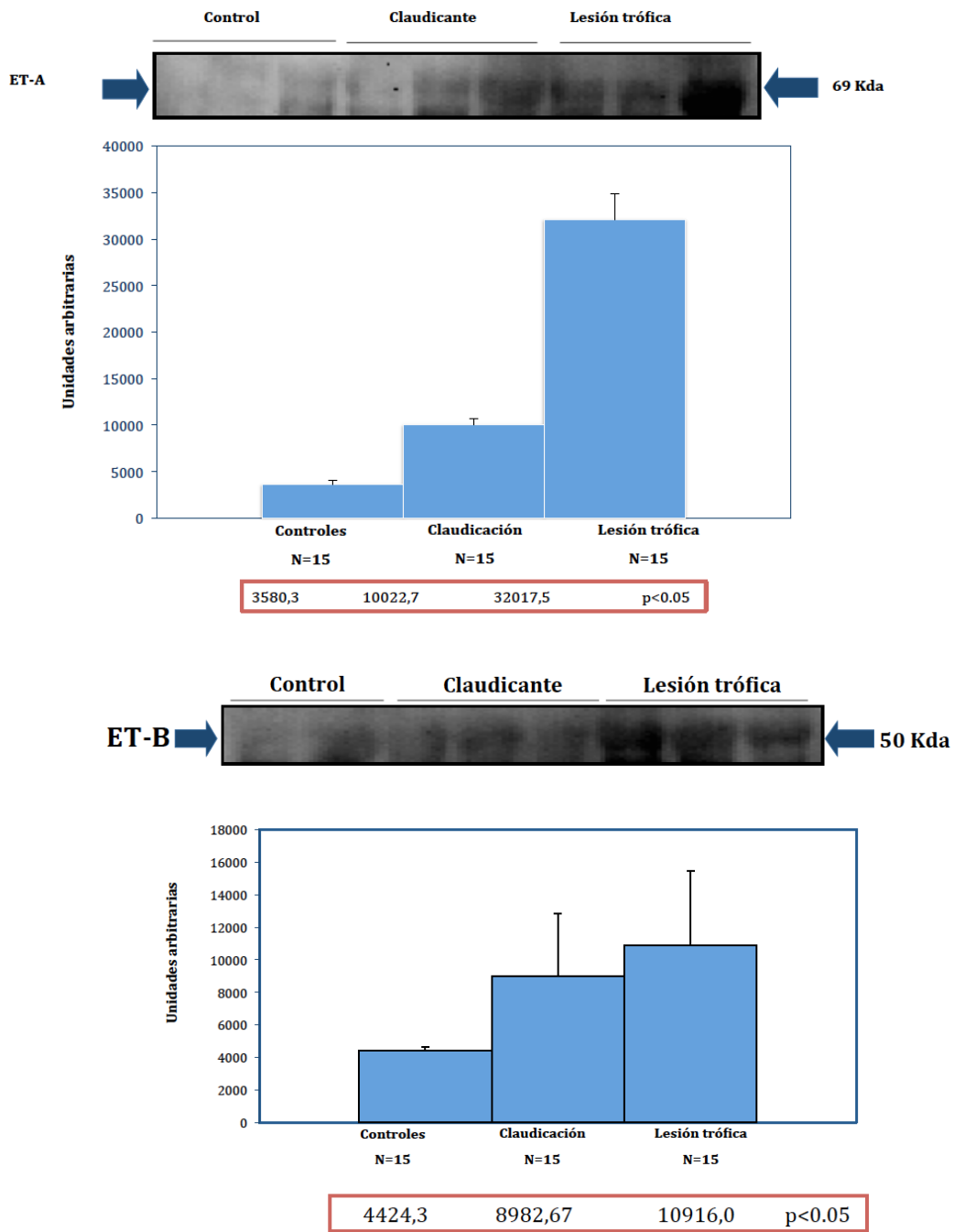


Figura 6.5. Liberación de NO basal y tras administración de bosentán.

6.4. Expresión de receptores ET-A y ET-B

Se ha observado que en ambos grupos de EAP existe un aumento de expresión de los receptores ET-A y ET-B en leucocitos, con respecto al grupo control. Este aumento ha sido mayor en el grupo de lesiones tróficas, tanto para los receptores ET-A y ET-B. Cuando se analizó la ratio entre receptores ET-A/ET-B se ha

comprobado que es menor de 1 en el grupo control, lo que indica que este grupo son más numerosos los receptores ET-B. La ratio se ha invertido en el grupo de EAP, de forma que en el grupo de lesiones tróficas es 3 veces más frecuente la expresión de ET-A que ET-B.



DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

El sistema endotelina consiste en 3 péptidos de 21 aminoácidos (ET-1, ET-2 and ET-3). ET-1 es la forma predominante en los vasos y ha demostrado jugar un papel esencial en la fisiopatología cardiovascular.

ET-1 tiene afinidad por dos tipos diferentes de receptores ET-A y ET-B. Ambos receptores están expresados en las células musculares lisas vasculares y su acción media la vasoconstricción. El receptor ET-B está también expresado en las células endoteliales y su activación media la vasodilatación. También está implicado en el aclaramiento de la ET-circulante (Jandeleit-Dahm 2000).

El papel de la ET-1 como factor implicado en el desarrollo de la EAP es poco conocido, si bien se sabe que su acción es fundamentalmente paracrina y dependiente del tipo de receptor ET-A y ET-B sobre el que actúe.

En el sistema vascular, la endotelina vía activación de los receptores ET-A, ejerce un tono basal vasoconstrictor y contribuye al desarrollo de la enfermedad vascular en la arteriosclerosis y en la hipertensión (Schiffrin 1999; Barton 2000). La obesidad, que se asocia frecuentemente a la hipertensión, es una condición que se encuentra frecuentemente junto a diabetes y resistencia a la insulina, interviniendo en la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Barton et al. 2003). Estudios recientes sugieren que la proteinuria en los diabéticos está directamente asociada con la activación de la ET-1 (Zanatta et al. 2008) a través de los receptores ET-A.

En las células endoteliales la mayoría de los receptores de ET-1 con receptores

ET-B los cuales parecen estar implicados en la liberación de vasodilatadores como las prostaglandinas y el NO (Rodríguez-Pascual). Este aspecto ha sido confirmado recientemente en modelos de ratones en los que el endotelio no expresa ET-B (Bagnall 2006, Kelland 2010). Estos estudios demuestran que la pérdida selectiva de los receptores ET-B resultan en una exagerada respuesta hipertensiva a la hipoxia resultado de la producción reducida de vasodilatadores. Los niveles circulantes de ET-1 están aumentados en este modelo de ratones, lo que demuestra que los receptores ET-B están implicados en el aclaramiento de ET-1.

La relación entre la formación de la placa de ateroma y la ET-1 ha sido ampliamente demostrada. Niveles elevados de ET-1 se han encontrado en las placas de ateroma, correlacionando con la severidad de la enfermedad (Rossi 1999, Lerman 2001).

Esto también ha sido demostrado en modelos animales en los que niveles elevados de ET-1 inducen la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico y en la formación de la placa de ateroma (Simeone 2011). La formación de dicha placa de ateroma puede revertirse en estos modelos animales mediante la administración de bloqueantes de receptores de ET-A y ET-A/ET-B (Barton 1998, Best 1999).

Debido al aumento de la actividad del sistema endotelina en la diabetes mellitus hemos elegido para el presente estudio a pacientes diabéticos con EAP, claudicantes y con lesiones tróficas, comparándolos con sujetos no diabéticos libres de la enfermedad. De esta forma pretendemos evaluar el sistema ET-1 en la diabetes mellitus y en las diferentes fases de la arteriopatía periférica.

Ha sido demostrado (Cardillo 2002) que el bloqueo de los receptores de ET-A

produce vasodilatación en pacientes diabéticos pero no en controles sanos, lo que sugiere que la actividad vasoconstrictora ET-A dependiente está aumentada en la diabetes.

Diferentes mecanismos podrían estar implicados en este aumento de la respuesta presora ET-A dependiente, como un aumento de la biodisponibilidad de ET-1 por el receptor ET-A o un aumento de la susceptibilidad vascular a los efectos vasoconstrictores de la ET-1 que podría estar relacionada con un incremento en la producción de ET-1.

En la DM por tanto parece existe un tono vasomotor mediado por ET-1 lo que se pone de manifiesto al administrar antagonista ET-A intrarterial. En el sano no modifica el flujo sanguíneo, si bien en DM existe un aumento del flujo sanguíneo tras la administración de dicho antagonista (Cardillo 2002).

El desencadenante inicial por el que los niveles elevados de glucosa alteran la función vascular es el desbalance entre la biodisponibilidad de NO y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Creager 2003). De hecho, la generación de anión superóxido (O_2^-) inducido por la hiperglucemia inactiva NO para formar peroxinitratos ($ONOO^-$), un potente oxidante que penetra fácilmente en las membranas fosfolipídicas. La nitrosilación proteica inhibe la acción de proteínas endoteliales como la eNOS (Hink 2001). Estos procesos son muy importantes ya que la reducción de biodisponibilidad del NO se ha asociado como un potente predictor de eventos adversos cardiovasculares (Lerman 2005).

La sobreproducción de ROS por la mitocondria es considerada como el nexo de unión entre los niveles elevados de glucosa y la mayoría de los mecanismos

implicados en el daño vascular que se produce en la diabetes (Nisikawa 2000).

La hiperglucemia induce una elevación crónica de diacilglicerol en las células endoteliales con la subsecuente translocación en membrana de las formas habituales de PCK (proteín-kinasa C) (α , β_1 y β_2) a isoformas no convencionales (δ). Una vez activada la PKC, es responsable de diferentes cambios estructurales y funcionales en el lecho vascular, incluyendo alteraciones en la permeabilidad, inflamación, angiogénesis, crecimiento celular, expansión de la matriz extracelular y apoptosis (Geraldés 2010). Una importante consecuencia de la activación de la PKC es la generación de ROS. PKC afecta a la biodisponibilidad de NO de dos formas. Por una parte, mediante la acumulación intracelular de PKC y por otra mediante el descenso en la actividad eNOS (Du 2001).

En nuestro estudio hemos comprobado como la liberación de O₂ está claramente reducida en el grupo de pacientes con lesiones tróficas, con respecto al grupo de controles. Esto es congruente con lo anteriormente expuesto en diferentes estudios y podría estar relacionado con una sobreproducción de ROS que inhibiría la acción de la proteína endotelial eNOS en pacientes con isquemia crítica.

El antagonista ET-A/ET-B bosentán ha demostrado en nuestro estudio un aumento de la capacidad de síntesis y liberación de NO tanto en los controles no diabéticos como en los pacientes con lesiones tróficas, casi hasta triplicar los niveles basales de NO. Esto podría deberse a un capacidad de bloqueo mayor para los receptores ET-A que ET-B, resultando en un aumento de la actividad eNOS.

Algunas líneas de investigación sugieren que el sistema endotelina puede

contribuir al desarrollo de la enfermedad vascular en la diabetes. Los niveles de ET-1 están elevadas en los pacientes diabéticos (Takahashi 1990). Así mismo, se ha comprobado una correlación entre niveles de ET-1 y la presencia de complicaciones de la diabetes, como microalbuminuria y retinopatía (Haak 1992). En modelos animales también se ha comprobado un incremento de la ET-1 en la diabetes (Harris 2005).

El efecto de la ET-1 es complejo en la diabetes mellitus. En estudios realizados en modelos de ratas con diabetes tipo II [Alabadi 2004] se ha comprobado una hipersensibilidad a la acción de la ET-1 en arteria basilar junto con una reducción de la capacidad vasodilatadora. El bloqueo ET-A en estos animales restauró la capacidad de vasorrelajación. Este mismo grupo observó el efecto paradójico de los receptores ET-B, de forma que en la diabetes existe un aumento de la expresión de estos receptores en las células de músculo liso condicionando una respuesta paradójicamente presora. Este efecto dual de los receptores ET-B pudo bloquearse con el bloqueante de los receptores ET-A y ET-B, bosentán.

También se ha comprobado la implicación de la ET-1 en el remodelado vascular observado en la diabetes. ET-1 está asociada con el desarrollo de la placa de ateroma vía estimulación del crecimiento de células musculares lisas, migración celular, remodelado de la matriz extracelular y aumento de la expresión de factores de crecimiento (Rodríguez-Vita 2005).

Se ha observado que en pacientes diabéticos la acción de los ET-B estaría alterada de forma que su sobreexpresión en las células musculares lisas de la pared arterial tendría unos efectos similares de vasoconstricción a los receptores ET-A (Ergul 2011), por lo que en pacientes diabéticos el bloqueo ET-A y ET-B

podría tener efectos más beneficiosos que el bloqueo ET-A aislado. Basado en este efecto paradójico de los receptores ET-B en la diabetes, hemos querido estudiar el efecto del bloqueante bosentán, antagonista de los receptores ET-A y ET-B. Algunos estudios sugieren que la endotelina puede contribuir a la resistencia a la insulina y a la disfunción vascular. In vitro, la exposición celular mantenida a ET-1 induce resistencia a la insulina (Ishibashi 2001, Jiang 1999). En estudios in vivo con ratas, la inyección intraperitoneal de ET-1 se ha comprobado que induce un aumento de la glucosa endógena y de los niveles de insulina, así como un descenso de la respuesta a la insulina (Juan 1996). En este sentido, la ET-1 administrada en humanos induce resistencia a la insulina (síndrome euglucemia-hiperinsulinemia) (Ottosson-Seeberger 1997).

En los estadios iniciales, el desbalance entre el aumento de vasoconstrictores como la ET-1 y la disminución de la actividad de NO debida a estrés oxidativo de la hiperglucemia, resultan en una disminución de la relajación vascular. Esta situación crónica finalmente condiciona daño estructural, trombosis y el depósito de plaquetas en la pared vascular (Kalani 2008, Lam 2001). En nuestro estudio hemos comprobado que bosentán ha invertido este desequilibrio ET-1/NO, lo que podría tener consecuencias favorables para los pacientes diabéticos con EAP. La ET-1 no sólo actúa como vasoconstrictor, si no que además estimula la proliferación de células musculares lisas vasculares, promueve la fibrosis y la inflamación. Este efecto pro-inflamatorio de la ET-1 sin embargo no se ha asociado en este trabajo a un aumento de IL-6 en los pacientes diabéticos, aunque sí han presentado mayores niveles de PCR en las formas más avanzadas de la enfermedad. Hemos interpretado que la capacidad de liberar IL-6 tras la

administración de bosentán en los pacientes con lesiones tróficas podría reflejar la recuperación de la viabilidad de células biológicamente inactivas en los pacientes con formas más avanzadas de EAP.

También hemos estudiado los niveles de la interleukina anti-inflamatoria IL-10 en los 3 grupos de pacientes, no observándose diferencias significativas entre los grupos. La administración de bosentán tampoco se acompañó de diferente expresión de IL-10 en ninguno de los pacientes. En estudios realizados en pacientes con esclerodermia y úlceras digitales ya se han publicado resultados similares en los que los niveles de IL-10 son independientes de bosentán (Bellisai 2011).

Algunas evidencias que sugieren que la ET-1 está implicada en la arteriosclerosis incluyen los niveles elevados de ET-1 en pacientes con arteriosclerosis sintomática como la cardiopatía isquémica y el ictus (Yasuda 1990, Alioglu 2002). Además, se ha comprobado que los niveles de ET-1 correlacionan positivamente con el número de sectores afectados (Lerman 1991). Con respecto a la EAP, niveles elevados de ET-1 se han observado en la arteriopatía periférica, tanto en claudicantes como en pacientes con isquemia crítica (Mangiafico 1999, de Haro 2010). En el estudio de de Haro se comprobó un aumento de la ET-1 fundamentalmente en el grupo de claudicantes, lo que explicó como un agotamiento del endotelio en el grupo de lesiones tróficas. Sin embargo, en nuestro estudio como en otros (Mangiafico 1999), los claudicantes han presentado una menor actividad ET-1 que el grupo lesiones tróficas, lo que nos hace pensar que la ET-1 puede ser un marcador de severidad y mal pronóstico cardiovascular. En este sentido se ha demostrado que niveles elevados de ET-1 se han asociado con un

mayor riesgo de mortalidad cardiovascular (Newton 2005).

Se ha comprobado una correlación entre los niveles de ET-1 y el número de territorios vasculares afectados (coronario, ECV y EAP) (Lerman 1991).

La activación de la ET-1 se produce por factores de riesgo cardiovascular como la DM, la HTA y la hiperlipidemia (d'Uscio 2000). Este aumento de ET-1 produce un efecto antagonista sobre el NO, contribuyendo a la disfunción endotelial, que a su vez promueve la adhesión leucocitaria, y la migración celular originando la placa de ateroma (Bohm 2002). Esta placa a su vez es fuente de más ET-1, perpetuando así el daño endotelial.

En las placas de ateroma humanas se ha comprobado una mayor síntesis y liberación de ET-1 así como un mayor unión de ET-1 con receptores ET-A y ET-B (Rossi 1999). En arterias femorales enfermas obtenidas de pacientes con isquemia crítica se ha observado un aumento de la unión ET-1 con ET-A y ET-B en las células musculares lisas de la capa media (Dashwood 2011).

ET-1 podría estar implicada en el tono vasomotor que se observa en la edad avanzada. Se ha comprobado que en adultos jóvenes, la infusión de ET-1 se acompaña de disminución del flujo sanguíneo (Wray 2007). Esta reducción del flujo se invierte cuando se administran antagonistas de los receptores de la endotelina, si bien esta reducción es aún mayores en adultos de edad avanzada que en los jóvenes.

Se han demostrado niveles elevados de ET-1 tanto en claudicantes como en pacientes con isquemia crítica (Mangiafico 1999). Este grupo también ha demostrado que los pacientes con isquemia crítica presentan niveles de ET-1 que

los pacientes claudicantes, probablemente debido a una mayor activación mantenida del sistema ET-1 en las formas de enfermedad más avanzadas.

Por otra parte, de Haro Miralles et al (de Haro 2010), si bien han demostrado niveles más elevados de ET-1 en pacientes con EAP que en controles, comprobaron niveles de ET-1 mayores en claudicantes que en isquemia crítica, lo que podría implicar un daño endotelial avanzado y por tanto una menor capacidad de liberación de ET-1.

Parece que la activación del sistema endotelina podría ser sistémico debido a la afectación arterial, a veces asintomática, en otros territorios vasculares. En este sentido Newton et al. comprobaron que los niveles elevados de ET-1 observados en pacientes con isquemia crítica se mantenían elevados después de la amputación (Newton 2008). Apoyaría la teoría de una activación sistémica del sistema ET-1 el hecho de que los pacientes con niveles más altos de ET-1 presentaron una mayor mortalidad cardiovascular.

La ET-1 también está implicada en el daño observado en la microangiopatía. En músculo de pacientes con isquemia crítica se ha comprobado un aumento de la expresión de ET-1 así como de la unión ET-1 con los receptores ET-Ay ET-B en la microcirculación tisular (Tsui 2003). La participación de la ET-1 en la microangiopatía se ha demostrado en pacientes DM en los que la administración del antagonista de ET-A mejoró la perfusión tisular comprobado en los capilares del lecho subungueal (Settergren 2008). Además, en pacientes con isquemia crítica la infusión del antagonista de ET-A BQ123 aumentó la tensión transcutánea de oxígeno en el pie, lo que indicaba un incremento en la perfusión tisular local (Kalani 2008).

Pocos años después del descubrimiento de la endotelina fueron clonados los receptores de ET-1 y los bloqueantes selectivos de dichos receptores (Arai et al. 1990; Eguchi et al. 1992). En humanos, el efecto del bloqueo del receptor ET-A a nivel de la microcirculación ha sido estudiado en pacientes con diabetes tipo 2. La infusión de bloqueantes de los receptores ET-A, mejoraron la microcirculación a nivel de la piel (Settergren 2008). Este grupo demostró en pacientes con isquemia crítica no revascularizable, que la infusión de bloqueantes ET-A, se asoció a un aumento de la tensión transcutánea de oxígeno y de la presión en el pie (Kalani 2008). En este sentido pensamos que la administración de bosentan a través del bloqueo ET-A y ET-B podría frenar e incluso revertir la acción de la ET-1, lo que podría acompañarse de un mejor pronóstico para los pacientes con EAP incluso en fases avanzadas.

La disfunción endotelial, término que define un status de menor reactividad vascular acompañado de inflamación y trombosis, frecuentemente precede a las manifestaciones de diferentes enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis. En estos pacientes se han observados niveles elevados de ET-1 que podrían estar implicados en la disfunción endotelial (Lerman 1991, Ferri 1997). Si esta acción está mediada por los receptores ET-A o ET-B no es del todo claro. Bloqueantes duales de ET-A/ET-B como bosentán, son capaces de revertir el daño endotelial en modelos humanos y animales (Iglarz 2007). El teórico efecto beneficioso de los receptores ET-B que se observa en sujetos sanos se pierde en condiciones patológicas lo que implica una alteración de la expresión en estas situaciones. (Bohm 2002, Verhaar 1998).

Una observación común en modelos animales con arteriosclerosis es que el

tratamiento crónico con bloqueantes de los receptores ET-A se asocia a vasodilatación mediada por NO (Barton 2000). Este aumento de la vasodilatación NO dependiente puede ser bloqueado por antagonistas ET-B (Verhaar et al. 1998).

En nuestro estudio se ha comprobado un aumento en la expresión de receptores ET-A leucocitarios en los pacientes con EAP, fundamentalmente en los que presentaban lesiones tróficas. Sin embargo, también se han expresado en mayor medida los receptores ET-B en los pacientes con lesiones tróficas, como se ha comprobado que ocurre en la diabetes en otros estudios como el de Ergul (Ergul 2011). Hemos comprobado una ratio ET-A/ET-B menor de 1 en los controles. Esta ratio sin embargo se ha invertido, fundamentalmente en los pacientes con EAP, lo que parece justificar que el estado pro-trombótico mediado por ET-1 podría explicarse por una sobreexpresión ET-A.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. Los niveles de ET-1 plasmática, mayores en los pacientes con EAP que en el grupo control y a su vez mayores en el grupo de pacientes con lesiones tróficas que en el grupo de claudicantes, podría indicar que la ET-1 juega un papel importante en el desarrollo y en la progresión de la arteriopatía periférica en los pacientes diabéticos.
2. Se ha observado que en las formas más avanzadas de EAP existe un descenso de la capacidad de respuesta inflamatoria expresada por una reducción de los niveles plasmáticos de IL-6, probablemente secundario al daño vascular que caracteriza a la EAP.
3. En los pacientes con lesiones tróficas existe una disminución de la síntesis y liberación de óxido nítrico de forma que existe en estos pacientes un status protrombótico-vasconstrictor secundario al desbalance ET-1/NO.
4. El antagonista bosentán es capaz de recuperar la respuesta inflamatoria (elevación de IL-6) y vasodilatadora (elevación de niveles de NO), en los pacientes con EAP incluso en las fases más avanzadas de la enfermedad.
5. Los pacientes con EAP, y sobre todo los que presentan lesiones tróficas, presentan una sobreexpresión de ambos receptores de ET-1, fundamentalmente de ET-A, lo que podría justificar que en el estado protrombótico mediado por ET-1 parece explicarse por una sobreexpresión ET-A.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alabadi JA, Miranda FJ, Llorens S, Centeno JM, Marrachelli VG, Alborch E. Mechanisms underlying diabetes enhancement of endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Eur J Pharmacol* 2004; 486: 289–96.
2. Alioglu Z, Orem A, Bulbul I, Boz C, Ozmenoglu M, Vanizor B. Evaluation of plasma endothelin-1 levels in patients with cerebral infarction. *Angiology* 2002; 53: 77–82.
3. Andersen HO, Holm P, Stender S, Hansen BF, Nordestgaard BG. Dosedependent suppression of transplant arteriosclerosis in aorta-allografted, cholesterol-clamped rabbits. Suppression not eliminated by the cholesterol raising effect of cyclosporine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2515-23.
4. Badimon JJ, Zaman A, Helft G, Fayad Z, Fuster V. Acute coronary syndromes: pathophysiology and preventive priorities. *Thromb Haemost* 1999; 82(2): 997-1004.
5. Badimón L, Martínez-González J. Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55 (Supl 1): 17-26
6. Badimón L. Estatinas y función endotelial. *Rev Esp Cardiol* 2003; 3: 25-40.
7. Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol* 2006;6 (Supl 1):21-30.
8. Bagnall AJ, Kelland NF, Gulliver-Sloan F, Davenport AP, Gray GA, Yanagisawa M, et al. Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. *Hypertension* 2006; 48: 286–93.
9. Balsiger B, Rickenbacher A, Boden PJ, Biecker E, Tsui J, et al: Endothelin A-receptor blockade in experimental diabetes improves glucose balance and gastrointestinal function. *Clin Sci (Lond)*. 2002; 103 (Supl 48): 430-433.
10. Baron AD, Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G: Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation contributes to both insulin sensitivity and responsiveness in lean humans. *J Clin Invest* 1995; 96: 786–792.
11. Barton M, Haudenschild CC, d’Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14367–72.
12. Barton M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics. *Curr Hypertens Rep* 2000; 2(1): 84-91.

13. Barton, M., Carmona, R., Ortmann, J., Krieger, J.E., and Traupe, T. 2003. Obesity-associated activation of angiotensin and endothelin in the cardiovascular system. *Int J Biochem Cell Biol*; 35: 826–837.
14. Bellisai F, Morozzi G, Scaccia F, Chellini F, Simpatico A, et al. Evaluation of the effect of Bosentan treatment on proinflammatory cytokine serum levels in patients affected by Systemic Sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; 24(1): 261-4.
15. Berthiaume N, Wessale JL, Opgenorth TJ, Zinker BA: Metabolic responses with endothelin antagonism in a model of insulin resistance. *Metabolism* 2005; 54: 735–740.
16. Berthiaume N, Carlson CJ, Rondinone CM, Zinker BA. Endothelin antagonism improves hepatic insulin sensitivity associated with insulin signaling in Zucker fatty rats. *Metabolism* 2005; 54: 1515–1523.
17. Best PJ, McKenna CJ, Hasdai D, Holmes Jr DR, Lerman A. Chronic endothelin receptor antagonism preserves coronary endothelial function in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* 1999; 99: 1747–52.
18. Bhattacharya I, Ullrich A. Endothelin-1 inhibits adipogenesis: role of phosphorylation of Akt and ERK1/2. 2006; 580: 5765–5771.
19. Bohm F, Ahlborg G, Johansson BL, Hansson LO, Pernow J. Combined endothelin receptor blockade evokes enhanced vasodilatation in patients with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 674–9.
20. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 101: 353-63.
21. Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993; 91: 1800-9.
22. Bourcier T, Sukhova G, Libby P. The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 15817-24.
23. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, et al.: Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1856–1862.
24. Cai W, Devaux B, Schaper W, Schaper J. The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the

- development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1997; 131: 177-86.
25. Cardillo C, Campia U, Bryant MB, et al. Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106: 1783-1787.
26. Cardillo C, Campia U, Iantorno M, Panza JA. Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension* 2004; 43: 36-40.
27. Chang I, Williams C, Baynach A, Skatch A, Yanagisawa M. Being starved and cold: the life without endothelin-2. 10th International Conference on Endothelin. Bergamo, Italy. 16- 19 September 2007. Abstract O-12.
28. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, et al. Effects of the dual endothelin receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358: 1119-1123.
29. Chatziantoniou C, Dussaule JC.. Insights into the mechanisms of renal fibrosis: is it possible to achieve regression? *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005; 289: 227-234.
30. Chin JE, Dickens M, Tavare JM, Roth RA. Overexpression of protein kinase C isoenzymes alpha, beta I. *J Biol Chem* 1993; 268: 6338-47.
31. Chuquet J, Benchenane K, Toutain J, MacKenzie ET, Roussel S, Touzani O. Selective blockade of endothelin-B receptors exacerbates ischemic brain damage in the rat. *Stroke* 2002; 33: 3019-25.
32. Clark JM, Glagov S. Luminal surface of distended arteries by scanning electron microscopy: eliminating configurational and technical artefacts. *Br J Exp Pathol* 1976; 57: 129-35.
33. Cleland SJ, Petrie JR, Shinichiro U, Elliott HL, Connell JMC: Insulin-mediated vasodilation and glucose uptake are functionally linked in humans. *Hypertension* 1999; 33: 554-558.
34. Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992; 140: 301-16.
35. Collier A, Leach JP, McLellan A, Jardine A, Morton JJ, Small M. Plasma endothelin-like immunoreactivity levels in IDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 1992; 15: 1038-40.
36. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappa B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 2001;107: 255-64.
37. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease:

- Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. Circulation 2003; 108: 1527 – 1532.
38. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. Science 1991; 251: 788-91.
 39. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. J Biol Chem 1999; 274: 1865–8.
 40. Dashwood MR, Timm M, Muddle JR, Ong AC, Tippins JR, Parker R, et al. Regional variations in endothelin-1 and its receptor subtypes in human coronary vasculature: pathophysiological implications in coronary disease. Endothelium 1998; 6: 61–70.
 41. Dashwood MR, Tsui JCS. Endothelin-1 and atherosclerosis: potential complications associated with endothelin-receptor blockade. Atherosclerosis 2002; 160: 297–304.
 42. Dashwood MR, Tsui JC. Further evidence for a role of endothelin-1 (ET-1) in critical limb ischaemia. J Cell Commun Signal. 2011; 5: 45-49.
 43. Davenport AP. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. Pharmacol Rev 2002; 54: 219–226.
 44. De Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? Cardiovasc Res 1999; 41: 443-9.
 45. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. J Clin Invest 1995; 96: 60-8.
 46. de Haro MJ, Gonzalez AF, Varela CC, Garcia FA. Onset of peripheral arterial disease: role of endothelin in endothelial dysfunction. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2010; 10: 760–5.
 47. Demer LL, Tintut Y. Osteopontin. Between a rock and a hard plaque. Circ Res 1999; 84: 250-2.
 48. Demer LL. A skeleton in the atherosclerosis closet. Circulation 1995; 92: 2029-32.
 49. Diamanti-Kandarakis E, Spina G, Kouli C, Migdalis I: Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 4666–4673.
 50. Dobrin PB. Distribution of lamellar deformations: implications for properties of the arterial media. Hypertension 1999; 33:806-10.

51. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the akt site. *J Clin Invest* 2001; 108: 1341 – 1348.
52. Dussaule JC, Chatziantoniou C. Reversal of renal disease: is it enough to inhibit the action of angiotensin II? *Cell Death Differ* 2007; 14: 1343–1349.
53. Eguchi S, Hirata Y, Ihara M, Yano M, Marumo F. A novel ETA antagonist (BQ-123) inhibits endothelin-1-induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1992; 302(3): 243-6.
54. Emori T, Hirata Y, Imai T, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, et al. Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 2409–11.
55. Ergul, A. Hypertension in black patients: an emerging role of the endothelin system in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 2000; 36: 62–67.
56. Ergul A. Endothelin-1 and diabetic complications: Focus on the vasculature. *Pharmacol Res* 2011; 63(6): 477-82.
57. Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 1984; 4: 323-40.
58. Farmer JA, Torre-Amione G. Atherosclerosis and inflammation. *Curr Atheroscler Rep* 2002; 4: 92-8.
59. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW et al. Atherosclerotic vascular disease conference: Writing group III: pathophysiology. *Circulation* 2004;109:2617-25.
60. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1999; 103: 897-905.
61. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Baldoncini R, Properzi G, Santucci A, De Mattia G: Circulating endothelin-1 levels in obese patients with the metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; 105: 38–40.
62. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Mazzocchi C, De Sisti L, et al. Elevated plasma and urinary endothelin-1 levels in human salt-sensitive hypertension. *Clin Sci (Lond)* 1997; 93: 35–41.

63. Fuster V, Badimon JJ, Badimon L. Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression. *Circulation* 1992; 86: 1-11.
64. Geraldès P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 2010; 106: 1319 – 1331.
65. Gimbrone MA Jr, Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* 1997; 99: 1809-13.
66. Goel A, Su B, Flavahan S, Lowenstein CJ, Berkowitz DE, Flavahan NA. Increased endothelial exocytosis and generation of endothelin-1 contributes to constriction of aged arteries. *Circ Res* 2010; 107: 242–51.
67. González-Pacheco H. From thrombin hypothesis to inflammation. Is it reality? *Arch Cardiol Mex* 2006;76:S233-8.
68. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002; 111: 927-30.
69. Haak T, Jungmann E, Felber A, Hillmann U, Usadel KH. Increased plasma levels of endothelin in diabetic patients with hypertension. *Am J Hypertens* 1992; 5: 161–6.
70. Hajjar DP, Haberland ME. Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem* 1997; 272: 22975-8.
71. Hallet MM, Praloran V, Vié H, Peyrat MA, Wong G, Witek-Giannotti J et al. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) gene expression in human T lymphocyte clones. *Blood* 1991; 77: 780-6.
72. Hansson GK, Holm J, Holm S, Fotev Z, Hedrich HJ, Fingerle J. T lymphocytes inhibit the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 10530-4.
73. Harris AK, Hutchinson JR, Sachidanandam K, Johnson MH, Dorrance AM, Stepp DW, et al. Type 2 diabetes causes remodeling of cerebrovasculature via differential regulation of matrix metalloproteinases and collagen synthesis: role of endothelin-1. *Diabetes* 2005; 54: 2638–44.
74. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-4.
75. Hieda HS, Gomez-Sanchez CE. Hypoxia increases endothelin release in bovine endothelial cells in culture, but epinephrine, norepinephrine, serotonin, histamine and angiotensin II do not. *Life Sci* 1990; 47: 247–51.

76. Hillier, C., Berry, C., Petrie, M.C., O'Dwyer, P.J., Hamilton, C., Brown, A., and McMurray, J. Effects of urotensin II in human arteries and veins of varying caliber. *Circulation* 2001; 103: 1378–1381.
77. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88: 14–22.
78. Hocher B, Thone-Reinecke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski R, Burst V, et al. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 1997; 99: 1380–1389.
79. Holvoet P, Davey PC, De Keyser D, Doukouré M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML et al. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1558-65.
80. Iglarz M, Clozel M. Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50: 621–8.
81. Ihling C, Gobel HR, Lippoldt A, et al. Endothelin-1-like immunoreactivity in human atherosclerotic coronary tissue: a detailed analysis of the cellular distribution of endothelin-1. *J Pathol* 1996; 179: 303–308.
82. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 1999; 85: 199-207.
83. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992; 19: 753–7.
84. Imamura T, Ishibashi K, Dalle S, Ugi S, Olefsky JM. Endothelin-1- induced GLUT4 translocation is mediated via G alpha-q/11 protein and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1999; 274: 33691–5.
85. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 1989; 264: 14954–9.
86. Irving RJ, Noon JP, Watt GC, Webb DJ, Walker BR: Activation of the endothelin system in insulin resistance. *QJM* 2001; 94(6): 321–326.

87. Ishibashi KI, Imamura T, Sharma PM, Huang J, Ugi S, Olefsky JM: Chronic endothelin-1 treatment leads to heterologous desensitization of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Clin Invest* 2001; 107: 1193–1202.
88. Jandeleit-Dahm K, Watson A. The endothelin system and endothelin receptor antagonists. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012, 21: 66–71.
89. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, et al: Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 1999; 104: 447–457.
90. Juan CC, Fang VS, Huang YJ, Kwok CF, Hsu YP, Ho LT: Endothelin-1 induces insulin resistance in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227: 694–699.
91. Kalani M, Pernow J, Bragd J, Jorneskog G. Improved peripheral perfusion during endothelin-A receptor blockade in patients with type 2 diabetes and critical limb ischemia. *Diabetes Care* 2008; 31(7): e56.
92. Kalani M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 1061–8.
93. Kalani M, Pernow J, Bragd J, Jorneskog G. Improved peripheral perfusion during endothelin-A receptor blockade in patients with type 2 diabetes and critical limb ischemia. *Diabetes Care* 2008; 31(7): e56.
94. Kawamura M, Ohgawara H, Naruse M, Suzudi N, Iwasaki N, Naruse K, et al. Increased plasma endothelin in NIDDM patients with retinopathy. *Diabetes Care* 1992; 15: 1396–7.
95. Kedzierski, R.M., and Yanagisawa, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 851–876.
96. Kelland NF, Kuc RE, McLean DL, Azfer A, Bagnall AJ, Gray GA, et al. Endothelial cell-specific ETB receptor knockout: autoradiographic and histological characterisation and crucial role in the clearance of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88: 644–51.
97. Ko C, Gieske MC, Al-Alem L, Hahn Y, Su W, Gong MC, et al. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology* 2006; 147: 1770–1779.
98. Ko CJ, Na G, Koo Y, Bridges P. Endothelin-2 (EDN2) in ovarian follicle rupture and oocyte transport. 10th International Conference on Endothelin. Bergamo, Italy. 16–19 September 2007. Abstract O-10.

99. Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1519-1522.
100. Kohan, D.E. The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15: 34-40.
101. Kohner EM, Patel V, Rassam SM. Role of blood flow and impaired autoregulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 1995; 44: 603-7.
102. Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest* 1991; 88: 1054-7.
103. Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC. Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. *Circulation* 1989; 80: 1747-56.
104. Kramer RH, Bensch KG, Davison PM, Karasek MA. Basal lamina formation by cultured microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* 1984; 99: 692-98.
105. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, et al. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159: 1435-40.
106. Lam HC. Role of endothelin in diabetic vascular complications. *Endocrine* 2001; 14: 277-84.
107. Lee ME, Dhady MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T. Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *J Biol Chem* 1991; 266: 19034-9.
108. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 997 - 1001.
109. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 2005; 111: 363-368.
110. Levy B, Tedgui A. *Biology of the arterial Wall. Basic Science for the Cardiologist, Vol 1*; Springer 1999.
111. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270: 319-24.

112. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-43.
113. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-74.
114. Lteif A, Vaishnava P, Baron A, Mather K. Endothelin Limits Insulin Action in Obese/Insulin- Resistant Humans. *Diabetes* 2007; 56: 728–734.
115. Lteif A, Vaishnava P, Baron AD, Mather KJ. Endothelin limits insulin action in obese/insulin-resistant humans. *Diabetes* 2007; 56: 728–734.
116. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000; 102: 2434–2440.
117. Macarthur H, Warner TD, Wood EG, Corder R, Vane JR. Endothelin-1 release from endothelial cells in culture is elevated both acutely and chronically by short periods of mechanical stretch. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 395–400.
118. Maguire JJ, Davenport AP. Is urotensin-II the new endothelin? *Br J Pharmacol* 2002; 137: 579–588.
119. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99: 348-53.
120. Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res* 2001; 88: 998-1003.
121. Mangiafico RA, Malatino LS, Santonocito M, Sarnataro F, Dell'Arte S, Messina R, et al. Plasma endothelin-1 levels in patients with peripheral arterial occlusive disease at different Fontaine's stages. *Panminerva Med* 1999; 41: 22–6.
122. Mangiafico RA, Malatino LS, Santonocito M, Spada RS: Plasma endothelin-1 concentrations in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non- diabetic patients with chronic arterial obstructive disease of the lower limbs. *Int Angiol* 1998; 17: 97–102,
123. Martínez-González J, Raposo B, Rodríguez C, Badimon L. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation. *Arterioscler Thromb Vascular Biol* 2001; 21: 804-9.
124. Masaki, T. The discovery of endothelins. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 530–533.

125. Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, et al. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95: 221–230.
126. Miura K, Yukimura T, Yamashita Y, Shimmen T, Okumura M, Yamanaka S, et al. Renal and femoral vascular responses to endothelin-1 in dogs: role of prostaglandins. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 11–7.
127. Miyauchi T, Goto K. Heart failure and endothelin receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20 (5): 210–217.
128. Mundy AL, Haas E, Bhattacharya I, Widmer CC, Kretz M, Hofmann-Lehmann R, et al. Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 368–375.
129. Murakoshi N, Miyauchi T, Kakinuma Y, Ohuchi T, Goto K, Yanagisawa M, et al. Vascular endothelin-B receptor system in vivo plays a favorable inhibitory role in vascular remodeling after injury revealed by endothelin-B receptor-knockout mice. *Circulation* 2002; 106: 1991–8.
130. Nett, P.C., Teixeira, M.M., Candinias, D., and Barton, M. Recent developments on endothelin antagonists as immunomodulatory drugs: from infection to transplantation medicine. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov.* 2006; 1(3): 265–276.
131. Newton DJ, Khan F, McLaren M, Kennedy G, Belch JJ. Endothelin-1 levels predict 3-year survival in patients who have amputation for critical leg ischaemia. *Br J Surg* 2005; 92: 1377–81.
132. Newton DJ, Khan F, Kennedy G, Belch JJ. Improvement in systemic endothelial condition following amputation in patients with critical limb ischemia. *Int Angiol* 2008; 27: 408–12.
133. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787 – 790.
134. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97: 2494-8.

135. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. Increased neutrophilplatelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94: 1239-46.
136. Ottosson-Seeberger A, Lundberg JM, Alvestrand A, Ahlborg G: Exogenous endothelin-1 causes peripheral insulin resistance in healthy humans. *Acta Physiol Scand.* 1997; 161: 211–220.
137. Pang IH, Yorio T. Ocular actions of endothelins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 215: 21–34.
138. Papanicolau DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 1998; 128: 127-37.
139. Piatti P, Fragasso G, Monti LD, Caumo A, Van Phan C, Valsecchi G, et al: Endothelial and metabolic characteristics of patients with angina and angiographically normal coronary arteries: comparison with subjects with insulin resistance syndrome and normal controls. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 1452–1460.
140. Proven A, Roderick HL, Conway SJ, Berridge MJ, Horton JK, Capper SJ et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *J Cell Sci.* 2006; 119: 3363–3375.
141. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990; 344: 254-7.
142. Rambaldi A, Young DC, Griffin JD. Expression of the M-CSF (CSF-1) gene by human monocytes. *Blood* 1987; 69: 1409-13.
143. Remuzzi, G., Perico, N., and Benigni, A. 2002. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 986–1001. doi:10.1038/nrd962. PMID: 12461520.
144. Rodriguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, Lagares D, Martinez-Ruiz A, Kleinert H, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 7139–55.
145. Rodríguez-Pascual F, Busnadiégoa O, Lagaresa D, Lamasa S. Role of endothelin in the cardiovascular system. *Pharmacological Research.* 2011; 63 (6): 463–472.
146. Rodríguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Sanchez-Lopez E, Plaza JJ, et al. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth

- factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2005; 97: 125–34.
147. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. Dynamics and plasticity of weibel-palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1002–7.
148. Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Ord VA, Witztum JL, Steinberg D. Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol* 1992; 140: 291-300.
149. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (I). *N Engl J Med* 1976; 295: 369-77.
150. Rossi GP, Colonna S, Pavan E, Albertin G, Della Rocca F, Gerosa G, et al. Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo. *Circulation* 1999; 99: 1147–55.
151. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986; 250: 822-7.
152. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2002; 346: 896–903.
153. Rubin LJ, Hoeper MM, Klepetko W, Galie N, Lang IM, Simonneau G. Current and future management of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from diagnosis to treatment responses. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3: 601–607.
154. Sachidanandam K, Portik-Dobos V, Harris AK, Hutchinson JR, Muller E, Johnson MH, et al. Evidence for vasculoprotective effects of ETB receptors in resistance artery remodeling in diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 2753–8.
155. Said SA, Ammar el SM, Suddek GM: Effect of bosentan (ET(A)/ET(B) receptor antagonist) on metabolic changes during stress and diabetes. *Pharmacol Res* 2005; 51:107–115.
156. Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996; 384: 353–355.
157. Sanchez R, MacKenzie A, Farhat N, Nguyen TD, Stewart DJ, Mercier I, et al. Endothelin B receptor-mediated regulation of endothelin-1 content and release in cultured porcine aorta endothelial cell. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 39: 652–9.
158. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P: Nitric oxide release

- accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 1994; 94: 2511–2515.
159. Schiffrin EL. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension* 1999; 34: 876–881.
160. Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7458-63.
161. Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2: 422-9.
162. Settergren M, Pernow J, Brismar K, Jorneskog G, Kalani M. Endothelin-A receptor blockade increases nutritive skin capillary circulation in patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *J Vasc Res* 2008; 45: 295–302.
163. Sidawy A, Sumpio B, DePalma R. The basic science of vascular disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 1638-1639.
164. Sieff CA, Niemeyer CM, Mentzer SJ, Faller DV. Interleukin-1, tumor necrosis factor, and the production of colony-stimulating factors by cultured mesenchymal cells. *Blood* 1988;72:1316-23.
165. Simeone SM, Li MW, Paradis P, Schiffrin EL. Vascular gene expression in mice overexpressing human endothelin-1 targeted to the endothelium. *Physiol Genomics* 2011; 43: 148–60.
166. Siren A-L, Lewczuk P, Hasselblatt M, Dembowski C, Schilling L, Ehrenreich H. Endothelin B receptor deficiency augments neuronal damage upon exposure to hypoxia–ischemia in vivo. *Brain Res* 2002; 945: 144–9.
167. Smith ML, Long DS, Damiano ER, Ley K. Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo. *Biophys J* 2003; 85: 637-45.
168. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 2002; 105: 2107-11.
169. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD: Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent: a novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994; 94: 1172– 1179.
170. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD: Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent: a novel action of insulin to

- increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994; 94: 1172– 1179.
171. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J* 2011; 25: 16–28.
172. Strawbridge AB, Elmendorf JS: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses endothelin-1-induced insulin resistance via an actin-dependent mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1698–1705.
173. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colonystimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 2001; 158: 879-91.
174. Takahashi K, Ghatgei MA, Lam HC, O'Halloran DJ, Bloom SR. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990; 33: 306–10.
175. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Takeda R. Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin induced diabetic rats. *Life Sci* 1991; 48: 2553–6.
176. Tedgui A, Mallat Z. Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 420-6.
177. Thijssen DH, Rongen GA, van Dijk A, Smits P, Hopman MT. Enhanced endothelin-1-mediated leg vascular tone in healthy older subjects. *J Appl Physiol* 2007; 103: 852–7.
178. Traupe T, Lang M, Goettsch W, Munter K, Morawietz H, Vetter W, Barton M. Obesity increases prostanoid-mediated vasoconstriction and vascular thromboxane receptor gene expression. *J Hypertens* 2002; 20: 2239–2245.
179. Tsui JC, Baker DM, Biecker E, Shaw S, Dashwood MR. Evidence for the involvement of endothelin-1 but not urotensin-II in chronic lower limb ischaemia in man. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003; 25: 443–50.
180. Uchida Y, Ninomiya H, Saotome M, Nomura A, Ohtsuka M, Yanagisawa M, et al. Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol* 1988; 154: 227–228.
181. d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Luscher TF. Endothelin in atherosclerosis: importance of risk factors and therapeutic implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: S55–9.
182. van Harmelen V, Eriksson A, Astrom G, Wahlen K, Naslund E, Karpe F et al. Vascular peptide endothelin-1 links fat accumulation with alterations of visceral adipocyte lipolysis. *Diabetes* 2008; 57: 378–386.

183. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* 1998; 97: 752–6.
184. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care* 2009; 32 (2): S314–21.
185. Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ: Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep* 2003; 3: 279–288.
186. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 44: 349-56.
187. Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD et al. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res* 1997; 80: 810-8.
188. Watson AMD, Li J, Schumacher C, et al. The endothelin receptor antagonist avosentan ameliorates nephropathy and atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia* 2010; 53: 192 – 203.
189. Webb ML, Meek TD. Inhibitors of endothelin. *Med Res Rev* 1997; 17: 17–67.
190. Weil BR, Westby CM, Van Guilder GP, et al. Enhanced endothelin-1 system activity with overweight and obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: 689–695.
191. Wettstein R, Morsdorf P, Bachle A, Amon M, Pittet B, Menger MD, et al. Selective blockade of endothelin-B receptor improves survival of critically perfused musculocutaneous flaps. *Langenbecks Arch Surg* 2007; 392: 331– 8.
192. Wight TN. Cellbiology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 1- 20.
193. Winkles JA, Alberts GF, Brogi E, et al. Endothelin-1 and endothelin receptor mRNA expression in normal and atherosclerotic human arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 1081 – 1088.
194. Wort SJ, Ito M, Chou PC, Mc Master SK, Badiger R, Jazrawi E, et al. Synergistic induction of endothelin-1 by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma is due to enhanced NF-kappa-b binding and histone acetylation at specific kappa-b sites. *J Biol Chem* 2009; 284: 24297–305.
195. Wray DW, Nishiyama SK, Donato AJ, Sander M, Wagner PD, Richardson RS. Endothelin-1-mediated vasoconstriction at rest and during dynamic exercise in healthy humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: 2550–6.

196. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411–415.
197. Yanagisawa M, and Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10: 374–378.
198. Yanagisawa, H., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Emoto, N., Williams, S.C., Takeda, S., et al. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest* 2000; 105: 1373–1382.
199. Yasuda M, Kohno M, Tahara A, Itagane H, Toda I, Akioka K, et al. Circulating immunoreactive endothelin in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1990; 119: 801–6.
200. Zanatta, C.M., Gerchman, F., Burttet, L., Nabinger, G., Jacques-Silva, M.C., Canani, L.H., and Gross, J.L. Endothelin-1 levels and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 80: 299–304.
201. Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1991; 83: 391–401.
202. Zhao B, Ehringer WD, Dierichs R, Miller FN. Oxidized low-density lipoprotein increases endothelial intracellular calcium and alters cytoskeletal f-actin distribution. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 48–54.

SUMMARY

SUMMARY .

Introduction:

Endothelin is the strongest vasopressor molecule and longer acting (Hillier et al 2001; Maguire and Davenport 2002), 100 times stronger than noradrenaline (Yanagisawa et al 1988; Luscher and Barton 2000). Endothelin is released in response to stress having a paracrine and autocrine action (Kedzierski and Yanagisawa 2001) with different physiological actions.

The plasma concentration of ET-1 is extremely low in normal conditions , while the vessel wall locally is 100 times higher , which suggests a fundamentally paracrine effect .

The ET-1 is the most biologically active isoform and accounts for approximately 80% of total ET (Yanagisawa and Masaky 1989; Ergul 2011).

In the vascular system, via the activation of endothelin ET -A receptors, exerts vasoconstricting basal tone and contributes to the development of vascular

The role of ET-B receptors in vascular regulation is more complex. For example, the ET-B receptors located on the vascular endothelium mediates vasodilation through the release of relaxing factors such as NO and prostacyclin (PGI₂). This receptor subtype may also determine vasoconstriction when the receptors are located on smooth muscle cells, like ET-A receptor. This phenomenon is observed in certain situations such as diabetes mellitus (Ergul 2011).

Therefore, any decrease in the activity of the ET- B receptors result in an increased synthesis of endothelin ET-1, a decrease in its clearance, and decreased production of NO and PGI-2, all resulting in a opposed activation of ET-A activity.

However, the pathological situations such as diabetes, activation of the ET-B receptors may condition opposite responses (Ergul 2011).

Objectives:

The main objectives of this thesis are:

1. To determinate in diabetic patients with claudication, diabetic patients with trophic lesions and in non-diabetic controls:

- the level of expression of ET.
- plasma levels of nitric oxide metabolites (NO).
- the expression of molecules involved in inflammation (IL-6, IL-10).

2. To analyze how the antagonist bosentan modifies the inflammatory response and the synthesis of the vasodilator molecule NO, in the same groups of individuals.

3. Determine whether there are differences in the expression of ET-A and ET-B receptors on leukocytes, in the same subjects.

Patients and methods :

In this thesis, there have been performed in vitro experiments in order to study the differences in the expression of plasma proteins in diabetic patients with peripheral arterial disease in different clinical stages (claudication and patients with critical limb ischemia) compared with nondiabetic controls. We also studied the expression of the ET -A and ET- B receptors on mononuclear cells in all 3 groups of patients in mononuclear cells incubated in vitro with the ET -A and ET- B receptor blocker bosentan.

Patients: 3 groups of subjects were selected. Ambulatory diabetic patients with intermittent claudication were selected at Vascular Surgery department. Patients with critical ischemia (rest pain and / or trophic lesions) were selected Vascular

Surgery Department. Finally, non-diabetic controls were selected from patients with benign prostatic hiperplasia or inguinal hernia, in order to have a sample of matched controls age and sex cases, without vascular disease.

Methods: We performed the following analytical techniques :

- Plasma levels of ET -1 expression : DOT - BLOT .
- Plasma concentrations of ILs : ELISA kits .
- Ability to release NO : nitrate + nitrite kit .
- Expression of ET -A and ET- B receptors : WESTERN - BLOT .

Statistical analysis: The densitometric data (DB and WB) were expressed in arbitrary densitometric units (ADU) , which are relative values of a measurement unit showing the ratio of a given amount of substance, intensity or other quantities regarding a reference value.

Results are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed with SPSS version 20.0. Significant value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

The statistical tests used were the Wilcoxon test when used quantitative variables in related groups, the Kruskal -Wallis test to analyze quantitative variables in groups of more than two Category Matches, the Chi-squared when the variables analyzed were qualitative.

Results:

ET-1 levels , IL-6 , IL-10 :

There has been an increased level of ET -1 in patients with claudication than in the control group , showing the trophic lesions group the highest levels (G1: 172.9 au, G2: 277.1 au and G3: 367.3 au, $p : 0.01$).

Were also found significant differences in the levels of the proinflammatory interleukin IL -6 (G1: 45.8 pg / ml , G2 : 16.4 pg / ml and G3: 9.8 pg / ml , p 0.02) .

The administration of bosentan reduced inflammatory response mediated by IL -6 in controls. The opposite effect was observed in the trophic lesions group. We observed an increase in the ability to release IL -6 in this group.

Release of nitric oxide (NO) :

The ability to release NO has been shown to be reduced at baseline in the group of trophic lesions compared to the control group. In both groups the administration of bosentan has increased the capacity of synthesis and release of NO so that the group of trophic lesions after administration of bosentan has the same levels of NO than the control group at baseline .

Expression of ET -A and ET- B receptors:

It has been observed that in both groups with PAD increased expression of ET-A and ET-B receptors in leukocytes, compared to the control group . This increase was greater in the group of trophic lesions for both ET -A and ET- B receptors. When the ratio ET-A/ET-B receptors is analyzed, it has been proved to be less than 1 in the control group, indicating that in this group the ET-B receptors are more frequent. The ratio has been inverted in the EAP group, so that in the group of tissue loss is 3 times more frequent expression of ET -A than ET -B.

Conclusions.

1. Higher plasma levels of ET-1 in patients with PAD than in the control group (and higher in the trophic lesions group than in the claudicant group), may indicate that ET-1 plays a important role in the development and progression of PAD in diabetes patients .

2. It has been observed that in the more advanced forms of PAD exists a decreased ability of inflammatory response expressed by a reduction in the plasma levels of IL-6 , probably secondary to vascular damage that characterizes PAD.
3. There is a decreased synthesis and release of nitric oxide in patients with trophic lesions. This can originate a prothrombotic-vasconstrictor status due to ET-1/NO imbalance.
4. Antagonist bosentan is able to recover the inflammatory response (increased IL-6) and vasodilator response (elevated levels of NO) in patients with PAD even in the most advanced stages of the disease.
5. Patients with PAD, especially those with trophic lesions, have an overexpression of both ET-1 receptors, ET-A fundamentally, which could justify the prothrombotic state mediated by ET-1.