

## V - DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudiaron los niveles de expresión génica y la distribución celular y tisular de los ligandos VIC/ET-2 y ET-1 y de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> del sistema endotelinas, tanto en tejidos adultos como durante el desarrollo embrionario del ratón.

Los estudios clínicos y experimentales muestran que el sistema ETs estaría involucrado primordialmente en los mecanismos de regulación de las funciones cardiovascular, renal y pulmonar (Schindler y col., 2006; Katona y col., 2006; Adams, 2006; Feldstein y Romero, 2007; Callera y col., 2007; Kim y Chapman, 2007). Recientemente se ha podido determinar que este sistema también actuaría en otras regiones del organismo, incluyendo los sistemas reproductor y endocrino (Donckier y col., 2006; Bagnato y Rosano, 2007; Lillie y col, 2007).

Atendiendo a la importante incidencia del sistema de ETs en un gran número de sistemas de vertebrados, este estudio centró su análisis primeramente en la evaluación de los niveles de expresión de VIC/ET-2 y ET-1. Las funciones de VIC/ET-2 son en general, poco conocidas, por lo que la discusión de los resultados del presente trabajo permiten proponer nuevos roles para el mismo. En contraste, el segundo péptido ha sido estudiado en profundidad y se le atribuyen múltiples funciones, por lo que en este estudio se lo utilizó como referencia para todos los sistemas analizados. En ésta primera etapa se realizó un estudio cuantitativo, comparando la expresión génica de las endotelinas VIC/ET-2 y ET-1 y de sus receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en diferentes órganos de ratones adultos; constituyendo el primer reporte de estas características realizado en esta especie. En una segunda etapa se analizó la expresión génica del sistema endotelinas durante el desarrollo murino. En una tercera etapa y en función de los resultados obtenidos, se diseñaron modelos experimentales para evaluar el rol de las ETs en intestino y piel murina. Para lograr estos estudios se puso a punto la técnica de PCR en tiempo real, que a diferencia de los métodos clásicos utilizados para cuantificar la expresión de las endotelinas, –Northern blot, ensayo de protección frente a la ARNasa, hibridación *in situ* y RT-PCR convencional– (Saida y Mitsui, 1991; Sakurai y col., 1991; Firth y Ratcliffe, 1992; de la Monte y col., 1995; Uchide y col., 1999), tiene como principales ventajas el relativamente menor tiempo de desarrollo, el requerir menor cantidad de material inicial y el hecho de que se elimina sustancialmente la contaminación de las muestras.

### V.1- LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL EN EL SISTEMA ETs

Los cebadores diseñados presentaron elevada especificidad (Uchide y col., 2001a; Adur y col., 2004), detectándose en los gels de agarosa una única banda de la longitud esperada. En algunos

órganos no se detectaron bandas en los geles de agarosa, aunque los ARNm para VIC/ET-2 pudieron ser cuantificados por PCR en tiempo real. En estos casos se postula que tal ausencia se debe a niveles muy bajos del transcripto, los cuales se encuentran por debajo de la sensibilidad de la técnica de electroforesis. Las variaciones entre experimentos fueron menores al 2% y similares a las halladas por otros autores (Heid y col., 1996; Gerard y col., 1998; Bustin, 2000). Estas variaciones mejoran significativamente los índices de aproximadamente el 14% reportados para las técnicas convencionales de RT-PCR (Zhang y col., 1997).

De especial importancia fue la evaluación de la invariabilidad de GAPDH como gen normalizador o de referencia. Es ampliamente conocido que para la validación del método, la expresión de dicho gen debe exhibir un nivel de expresión constante en diferentes condiciones fisiológicas de los tejidos u órganos y en los diferentes estadios del desarrollo de una especie y no debe ser afectada por las variaciones emergentes de las condiciones experimentales. La expresión de este gen ha sido reportada en numerosos estudios, demostrando tener un perfil constante en algunos sistemas, en diferentes etapas de la ontogenia y bajo distintas manipulaciones experimentales (Edwards y Denhardt, 1985; Winer y col., 1999). No obstante, otros reportes sugieren que el gen para GAPDH no siempre puede ser utilizado como gen normalizador (Oliveira y col., 1999; Thellin y col., 1999). Entre otros hechos, se ha demostrado que GAPDH exhibe variaciones inter-individuales significativas (Bustin y col., 1999; Bustin, 2000), en diferentes fases de la gestación (Cale y col., 1997), durante el desarrollo embrionario (Puissant y col., 1994; Calvo y col., 1997) y en las distintas fases del ciclo celular (Mansur y col., 1993). Debido a estos antecedentes contradictorios, se consideró un prerrequisito fundamental evaluar el comportamiento del gen GAPDH en el sistema experimental objeto de estudio. Este análisis demostró la ausencia de variaciones significativas en la expresión del gen, confirmando estudios previos realizados por el autor (Adur y col., 2003). Estos resultados justifican la utilización del gen GAPDH como gen normalizador en el sistema objeto de estudio.

Finalmente, las curvas estándar mostraron un amplio rango dinámico de trabajo y altos valores de correlación, corroborando estudios previos que demuestran que los sistemas de RT-PCR en tiempo real superan en estos parámetros a las técnicas de PCR convencional (Schmittgen y Zakrajsek, 2000). Asimismo, la evaluación demostró que la técnica de PCR en tiempo real también es más sensible para detectar y cuantificar la expresión de ARNm que las técnicas de *Northern blot*, ensayo de protección frente a la ARNasa y *RT-PCR* cuantitativa (Wang y Brown, 1999; Yuan y col., 2000). Como ventaja adicional debe destacarse, que este método posibilita el análisis simultáneo de múltiples muestras.

Con esta metodología de cuantificación no sólo se corroboraron y confirmaron resultados previos (Uchide y col., 1999; Saida y col., 2000; Uchide y col., 2000a), sino que también lograron detectarse por primera vez niveles de ARNms para VIC/ET-2 en órganos donde sus concentraciones se encuentran por debajo de los límites de sensibilidad de los métodos clásicos (Uchide y col., 2002; Adur y col., 2004; Takizawa y col., 2005; Adur y col., 2007).

## **V.2- ROLES DEL SISTEMA DE LAS ETs EN RATONES ADULTOS**

Los estudios de expresión génica en animales adultos han demostrado que las ETs y sus receptores –dada su virtual presencia en el endotelio vascular– se hallan ampliamente distribuidos en casi todos los órganos (Hosoda y col., 1991; Highsmith, 1998; Baltazares-Lipp y col., 2005), siendo éste el primer reporte que lo corrobora en ratón.

Analizando el patrón de expresión general de los ARNms de los péptidos, se encontró alta coincidencia con los resultados hallados utilizando las técnicas de ensayo de protección frente a la ARNasa (Firth y Ratcliffe, 1992) y PCR convencional (Huggins y col., 1993; Kubota y col., 1994; Magini y col., 1996; Uchide y col., 1999). Así, se detectó una moderada pero diferencial y específica expresión génica de VIC/ET-2 en el útero de esta especie (Uchide y col., 2001a). A lo largo del tracto digestivo (estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon y recto) se logran discriminar por primera vez los niveles de expresión de los ARNms para VIC/ET-2, comparándolos con la de los ARNms para ET-1. Particularmente en el intestino, dada la singular abundancia de los ARNms para VIC/ET-2, se realizó un estudio combinando técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia para determinar la localización celular - tisular de los péptidos en este órgano. Esto permitió plantear una hipótesis del mecanismo de acción diferencial de VIC/ET-2 y ET-1 en el intestino, la que se vio parcialmente corroborada con el modelo de colitis ulcerativa crónica ideopática desarrollada experimentalmente a tal efecto.

Otra contribución significativa de esta tesis es la detección de VIC/ET-2 en piel, lo que condujo al desarrollo de un modelo experimental para intentar explicar posibles roles de estos péptidos en la piel de vertebrados (Adur y col., 2004; Adur y col., 2007). Este es también el primer reporte sobre la detección de la expresión de VIC/ET-2 en hígado y bazo (Uchide y col., 2001a); cuyos niveles de expresión son muy bajos para ser detectados por las técnicas clásicamente utilizadas.

La comparación de los resultados encontrados en esta especie con los hallados en rata, utilizando la misma metodología (Uchide y col., 2000a; Adur y col., 2004), muestra una considerable homología en la expresión del sistema endotelina. ET-1 presenta un alto nivel de expresión en

casi todos los órganos examinados. Estudios tempranos en rata demostraron que el pulmón es el órgano que posee la mayor concentración de ET-1 (Matsumoto y col., 1989), lo cuál fue confirmado en el presente estudio en ratón (Uchide y col. 2001a). Por su parte, VIC/ET-2 presenta altos niveles de expresión en estómago, ovario, intestino y pulmón en ambas especies (Takahashi y col., 1990; Liu y col., 1998; Uchide y col., 1999; Uchide y col., 2000a; Uchide y col., 2001a; Kozakai y col., 2002; Bernsand y col., 2003; Palanisamy y col., 2006; Ko y col., 2006). La única diferencia remarcable es la detectada en útero, donde adicionalmente a niveles similares de expresión del ARNm para ET-1, se encuentra una moderada expresión de ARNm para VIC/ET-2, el que no pudo ser detectado en rata (Uchide y col., 2000a). Estos resultados sugieren que las funciones del VIC/ET-2 en el útero serían especie dependientes. A continuación se discuten en forma particularizada los resultados hallados en los órganos en los que se verificaron las situaciones más relevantes en esta investigación.

*Funciones de ETs en útero.* Dado que VIC/ET-2 y ET-1 poseen similar afinidad por los dos receptores (Arai y col., 1990; Sakurai col., 1990), se ha postulado que ambos péptidos podrían actuar de modo compensatorio y cooperativo en el útero de esta especie (Uchide y col., 2000b; Uchide y col., 2001b). Dicho rol estaría circunscripto sólo a ET-1 en el útero de la rata. En ratón, el ARNm para VIC/ET-2 es producido por células del miometrio, verificándose drásticas fluctuaciones de su expresión durante el ciclo estral y la preñez (Uchide y col. 2000b). Al presente, no hay una explicación clara para estos cambios. Sin embargo, este comportamiento se relacionaría con la regulación de las hormonas esteroides ováricas (estrógeno y progesterona), ya que la concentración plasmática de estos agentes sufre grandes variaciones durante la preñez (McCormack y Greenwald, 1974) y el ciclo estral (Greep y col., 1973). Se ha postulado que las hormonas esteroides ováricas regulan la expresión y la producción de factores de crecimiento y citoquinas en útero; incluyendo el factor de unión a heparina similar al de crecimiento epidérmico (Wang y col. 1994; Zhang y col. 1994; Zhang y col., 1998), el factor- $\alpha$  de crecimiento transformante (Nelson y col., 1992), el factor de crecimiento epidérmico (Huet Hudson y col., 1990), las interleuquinas-1 y -6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Mamata y col. 1992). Por otro lado, se ha encontrado que la localización de la ET-1 en el útero de conejo (Maggi y col., 1991) y de oveja (Riley y col., 1994) es afectada por la administración de hormonas esteroides ováricas. Adicionalmente, Domali y colaboradores demostraron que la ET-1 afecta diferencialmente la contractilidad uterina en mujeres pre- y posmenopáusicas, sugiriendo que las hormonas esteroides ováricas jugarían un importante rol en la sensibilidad del útero a la ET-1 (Domali y col., 2001; Domali y col., 2005). Estudios preliminares, mostraron un comportamiento similar en

el útero de ratón cuando se utilizaron hormonas esteroides exógenas (Uchide y col., 2000b).

Tomando estos reportes en conjunto, se puede hipotetizar que la fluctuación de la expresión de ARNm y la producción de ET-1 y VIC/ET-2 estaría regulada directa o indirectamente por hormonas esteroides ováricas para mediar localmente las acciones de éstas, tal como ocurre con citoquinas y factores de crecimiento (Uchide y col., 2000b; Uchide y col., 2001b).

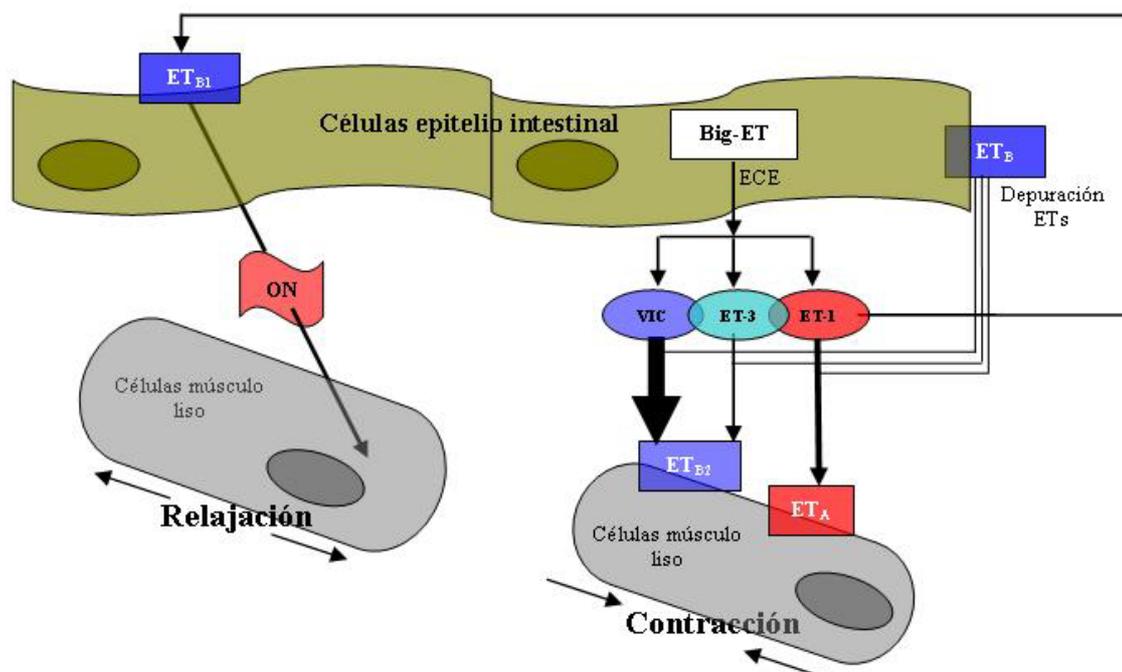
En relación con los receptores, se ha demostrado que en humanos, tanto ET<sub>A</sub> como ET<sub>B</sub> son expresados también en las células del miometrio (Bacon et al., 1995). Un hecho a destacar lo constituye el que el receptor ET<sub>B</sub> se expresa en mayor proporción que ET<sub>A</sub> en el útero no gestante, invirtiéndose esta relación durante la preñez y una vez producido el alumbramiento, estadios en los que ET<sub>A</sub> acompaña estrechamente el comportamiento de los ligandos (Uchide y col., 2000b). Coincidiendo con estos datos, se ha reportado que durante la preñez las células del miometrio humano incrementan la proporción de ET<sub>A</sub> sobre la de ET<sub>B</sub> (Osada y col., 1997). Concurrentemente, se ha verificado que la contracción uterina y la frecuencia de oscilación en respuesta a ET-1 son mediadas por ET<sub>A</sub> (Tsunoda y col., 1993; Heluy col., 1995). Puesto que VIC/ET-2 tiene casi la misma selectividad y afinidad por los receptores que ET-1, se postula que el receptor ET<sub>A</sub> podría ser crítico en la efectividad de VIC/ET-2 y ET-1 en el útero durante el ciclo estral y la preñez.

*Funciones de ETs en intestino.* Como se indicó previamente, en esta tesis se discriminó regionalmente la expresión de VIC/ET-2, ET-1 y los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en intestino de ratón. Estudios previos han demostrado que en dicho sistema también se expresa la ET-3 (Matsumoto y col., 1989; Shiba y col., 1992; Uchide y col., 1999). En todos los casos la expresión de ARNm para VIC/ET-2 resultó superior a la de ET-1, salvo en el recto (Takizawa y col., 2005). Este patrón de expresión es parcialmente coincidente al observado por de la Monte y colaboradores utilizando el método ensayo de protección frente a la ARNasa en rata (de la Monte y col., 1995).

Al presente no se ha determinado la distribución regional de ET-3, pero se sabe que este isopéptido se expresa en mayor proporción que ET-1 y en menor proporción que VIC/ET-2 (de la Monte y col., 1995; Uchide y col., 1999).

En el caso de los receptores, tanto para rata como para ratón, la expresión de ET<sub>B</sub> fue mayor a la de ET<sub>A</sub> a lo largo de todo el tracto digestivo (Adur y col., 2003). Sin embargo, en este estudio no se lograron discriminar los subtipos de receptores ET<sub>B</sub>. Se conoce que el subtipo ET<sub>B1</sub> posee una localización epitelial y su rol sería dilatador (Emori y col., 1990; Lin y Lee., 1992; Sokolovsky, 1992; Warner y col., 1993; Gray y col., 1994; Shyamala y col., 1994), en tanto el subtipo ET<sub>B2</sub>,

localizado principalmente en el músculo liso tendría un rol antagónico (Yoshinaga y col., 1992; Sokolovsky, 1992; Pollock y Opgenorth, 1993 y 1994; Shyamala y col., 1994). Por lo tanto, se postula aquí que dado que el epitelio intestinal produce los tres isopéptidos, el efecto de contracción no sería mediado sólo por el VIC/ET-2 como ha sido clásicamente postulado (Saida y col., 1989), sino que resultaría de la acción sinérgica de ET-1 sobre los receptores musculares de alta afinidad del tipo ET<sub>A</sub> y de VIC/ET-2 (y probablemente ET-3) sobre el subtipo de receptor ET<sub>B2</sub> de localización muscular. Para explicar la relajación intestinal, se postula que vía los receptores ET<sub>B1</sub> ubicados principalmente en el epitelio intestinal, ET-1 induciría la producción de ON y/o prostaglandinas, que a su vez inhibirían su síntesis. Así los procesos de contracción y relajación intestinal, resultarían de la sintonía entre ET<sub>A</sub> y ET<sub>B2</sub> y un delicado mecanismo de retroalimentación mediado por ET<sub>B1</sub> (Fig. 36).



**Figura 36:** Esquema de acción propuesto para las ETs en el proceso de contracción-relajación en el epitelio intestinal. ON: Oxido Nítrico, ECE: Enzima Convertidora de Endotelinas.

Pese a que la cuantificación por PCR en tiempo real de los ARNms para VIC/ET-2, ET-1 y sus receptores no muestran diferencias significativas a lo largo del tracto intestinal de ratón, en la presente tesis, gracias a la utilización de IHQ se verificaron diferencias regionales significativas en la expresión del sistema, sugiriendo la existencia de mecanismos de regulación en los procesos de traducción de dichos mensajeros. (Furuya y col., 2005).

Coincidiendo con las diferencias funcionales y estructurales que se verifican en la pared del

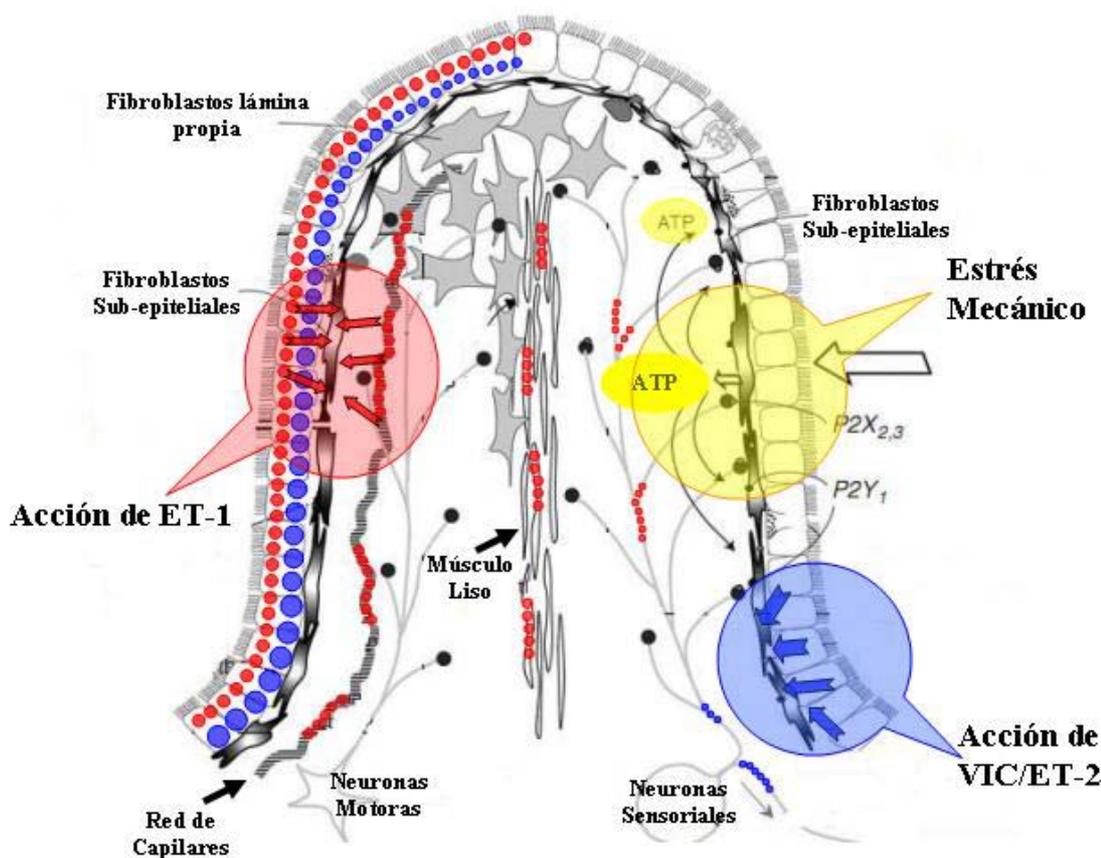
tracto digestivo, se observó una marcada regionalización de la inmunolocalización del péptido VIC/ET-2. Éste y su ARNm se hallan ampliamente distribuidos en las células epiteliales y más débilmente en las neuronas del plexo mientérico (Takizawa y col., 2005). La señal resultó de mayor intensidad en las cercanías de la membrana basal, que en el borde apical de las vellosidades del duodeno e íleon; invirtiéndose dicho patrón en el colon. Esta situación se diferencia con lo que ocurre con la expresión de ET-1, la que aparece homogéneamente inmunolocalizada en el eje de la vellosidad intestinal. Los tipos celulares que exhiben inmunomarcación para ET-1 son las células epiteliales intestinales, las células ganglionares de la submucosa, las del plexo mientérico, los mastocitos, los macrófagos y las células del endotelio vascular (Inagaki y col., 1991; Escrig y col., 1992; Liu y col., 1998; Egidy y col., 2000a; Massai y col., 2003; Takizawa y col., 2005).

Adicionalmente a las funciones de contracción – relajación y dada la particular distribución de los péptidos y sus receptores en este órgano (Egidy y col., 2000a; Takizawa y col., 2004; Takizawa y col., 2005; Furuya y col., 2005), se ha postulado que este sistema estaría implicado en la regulación de la función de tamiz / barrera, en los procesos de movilidad y en la mecanosensibilidad de las vellosidades intestinales. Esta regulación se efectuaría teniendo como blanco de acción a los fibroblastos subepiteliales y de la lámina propia. Esta hipótesis se refuerza porque recientemente se demostró que las ETs median los cambios morfológicos de los fibroblastos subepiteliales al modular las funciones mencionadas (Furuya y col., 2005). A su vez, se ha demostrado que estos fibroblastos poseen receptores para ETs (Egidy y col., 2000a y 2000b; Takizawa y col., 2004; Furuya y col., 2005; Furuya y Furuya, 2007). Los fibroblastos subepiteliales que exhiben un citoesqueleto contráctil de  $\alpha$ -actina de células musculares lisas ( $\alpha$ -SMA) y miosina de cadena pesada (Powell y col., 2005), van modificando su fenotipo a lo largo del eje de las vellosidades, desde una estructura plana con solapamiento de sus bordes en la parte inferior, para adquirir una forma estrellada y con mayor separación intercelular en la región apical (Komuro y Hashimoto, 1990; Desaki y Shimuzu, 2000). Esta red de fibroblastos subepiteliales recubre la lámina propia de las vellosidades y desempeñaría además un rol mecánico, manteniendo la flexibilidad y contractilidad de dichas estructuras.

*El rol de ETs en el control de la permeabilidad de las vellosidades intestinales.* La disposición de los fibroblastos y las fenestraciones de la membrana basal forman una especie de red o filtro, a través de cuyo entramado se produce la comunicación entre el epitelio y la lámina propia permitiendo el paso de nutrientes, agua y la migración de las células del sistema inmunitario (Desaki y Shimuzu, 2000). Coincidiendo con la disposición solapada de los fibroblastos las

fenestraciones son escasas y pequeñas en la parte inferior de las vellosidades (Desaki y Shimuzu, 2000). En la parte superior de éstas, donde la disposición de los fibroblastos es estrellada, las fenestraciones son numerosas y de mayor tamaño (Takahashi-Iwanaga y Fujita, 1985; Toyoda y col., 1997; Desaki y Shimuzu, 2000). Por lo tanto, esta distribución física crea un gradiente en el tamaño de la malla de la red explicando en parte, la discriminación de las funciones secretoras en la parte inferior de las vellosidades y absorptivas en la parte superior. Este patrón celular se correlaciona estrechamente con el gradiente de expresión del péptido VIC/ET-2 hallado. Así, se verifica que los mayores índices de expresión se dan sobre la región basal (fibroblastos aplanados), disminuyendo hacia el ápice (fibroblastos estrellados) de la vellosidad. Esta disposición sugiere fuertemente una relación entre fibroblastos y enterocitos, ya que la producción de VIC/ET-2 por estos últimos podría mediar un mecanismo paracrino para regular el entramado fibroblástico. Estudios *in vitro* han demostrado que los fibroblastos en cultivo sometidos a diferentes dosis de ETs, cambian su morfología celular (Furuya y col., 2005). Conforme se incrementan los niveles de AMPc éstos cambian su geometría de plana a estrellada, proceso que se revierte luego del agregado de ET-1 o ET-3, con la consecuente disminución de los niveles de AMPc (Furuya y Furuya, 1993). Los estudios con antagonistas específicos para los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (BQ123 y BQ788 respectivamente) sugieren que este cambio celular se realiza vía ambos receptores. En el mismo trabajo, se verificó que células endoteliales adyacentes a la red de fibroblastos presentan inmunorreactividad para ET-1, con lo que se postula que la regulación de la forma fibroblástica la realizarían estos péptidos (Furuya y col., 2005). Adicionalmente, se ha reportado que la ET-1 es sintetizada y liberada por las células epiteliales intestinales al ser estimulada por la interleuquina 2 (IL-2); la cuál puede ser secretada por los fibroblastos (Shigematsu y col., 1998). Por lo tanto, dada la localización de la ET-1 (Liu y col., 1998; Takizawa y col., 2005) en ratón y teniendo en cuenta los resultados anteriores, Furuya y colaboradores, proponen que la ET-1 liberada por las células endoteliales y los enterocitos regularía vía los receptores, el tamaño del entramado de la red de fibroblastos cambiando su morfología celular (Furuya y Furuya, 2007). Sin embargo, la presente tesis muestra que dado que ET-1 se expresa uniformemente a lo largo de las vellosidades intestinales, los cambios diferenciales en la morfología fibroblástica se deberían a los gradientes diferenciales de VIC/ET-2 más que a la presencia de ET-1. Puesto que VIC/ET-2 media la contracción intestinal a través del receptor ET<sub>B2</sub> (Fig. 36), se postula aquí que sería a través de este receptor que actuaría reforzando diferencialmente la disminución de los niveles de AMPc. Sin embargo, se requieren estudios funcionales adicionales a los desarrollados en esta tesis para verificar esta hipótesis.

Los cambios en la morfología fibroblástica se deberían a una reorganización del citoesqueleto celular, la que se ha demostrado exhiben las células como respuesta al proceso mitogénico inducido por las ETs. Así, la estimulación con factores de crecimiento induce una reorganización de los filamentos fibroblásticos de actina (Ridley y col., 1992; Ridley y Hall, 1992). Ridley y Hall han demostrado que pequeñas proteínas unidas a GTP, como la Rho, regulan la reorganización del citoesqueleto, la tensión en las fibras de actina y la formación de adhesiones focales; mientras que otras como la Rac, regularían la organización del citoesqueleto submembranoso condicionando la arquitectura de la membrana plasmática (Ridley y Hall, 1994). A la luz de los antecedentes discutidos precedentemente, se puede concluir que VIC/ET-2 y ET-1 son factores clave en el complejo control de la permeabilidad de las vellosidades intestinales. (Fig. 37). A su vez, las ETs regularían las propiedades mecánicas de contractilidad y tensión de estas vellosidades, actuando sobre sus fibroblastos.



**Figura 37:** Modelo representando esquemáticamente la distribución celular de VIC/ET-2 (círculos azules) y ET-1 (círculos rojos) y los posibles roles ejercidos sobre una vellosidad intestinal. VIC/ET-2 y ET-1 regularían, vía la interconversión de la forma celular fibroblástica, el tamaño del entramado de la barrera de filtración, la tensión, la contractilidad y la sensibilidad mecánica. Como se observa, el fenotipo fibroblástico cambia a lo largo del eje baso-apical de la vellosidad, coincidentemente con la expresión del VIC/ET-2 (Modificado de Furuya y col., 2005).

*Rol de las ETs en las propiedades mecánicas de las vellosidades intestinales.* Estudios previos han reportado que la señal de innumeración de proteínas asociadas al esqueleto contráctil de las vellosidades intestinales, es más intensa en los fibroblastos ubicados cerca de las criptas que los ubicados en el extremo apical de las vellosidades y muy débil en los fibroblastos de la lámina propia (Joyce y col., 1987). Particularmente en duodeno, los fibroblastos de la zona inferior de las vellosidades exhiben una intensa señal para  $\alpha$ -actina, mientras que la misma es débil o nula en la parte superior de éstas. Este descenso en la inmunoseñal podría deberse a una disminución en la expresión de  $\alpha$ -actina o a su despolimerización (Furuya y Furuya, 2007). Estos resultados sugieren que los fibroblastos de geometría plana se ven favorecidos en la contractilidad de su citoplasma y en el mantenimiento de la tensión, mientras que los de forma estrellada estarían desfavorecidos en dichos procesos (Furuya y Furuya, 2007). Por lo tanto, el borde basal de las vellosidades tendría una estructura favorecida para soportar más las tensiones que el borde apical, lo que le permitiría a este último moverse libremente para favorecer los mecanismos absortivos. También en relación con el citoesqueleto de las vellosidades, puede postularse una correlación entre el gradiente de expresión de VIC/ET-2 y  $\alpha$ -actina, ya que la expresión de ambas proteínas es alta en la parte inferior de las mismas, disminuyendo hacia el extremo apical (Fig. 37). Este gradiente de expresión sugiere una correlación entre los niveles de ETs y la movilidad de las vellosidades. Ésta última propiedad se ejerce, en parte por la contracción de la musculatura lisa ubicada en el centro de las vellosidades y en parte por la contracción de los fibroblastos. La contracción en el eje longitudinal de estas células podría ser inducida por el péptido VIC/ET-2. Esta hipótesis parece altamente verosímil dado que, además de inducir cambios morfológicos se ha demostrado que los fibroblastos subepiteliales pueden contraerse cuando son expuestos a ETs y ATP (Furuya y col., 2005). La aplicación de ATP (0,1 a 100  $\mu$ M) y de ETs (0,1 a 10 nM) inducen incremento de  $Ca^{2+}$ , seguido de contracción de las vellosidades (Furuya y col., 2005). La contracción inducida por el ATP exhibe respuestas transitorias mientras que la mediada por las ETs se sostiene por más tiempo. Por otra parte y apoyando los hallazgos precedentemente indicados, los estudios *in vitro* demostraron que los fibroblastos del colon exhiben una contracción persistente (10 a 15 minutos) cuando son expuestos a ET-1 (Kernochan y col., 2002), aunque en el duodeno la contracción sólo dura unos segundos (Furuya y col., 2005). Esta diferencia en la duración de la contracción podría explicarse en parte, por la mayor expresión de los ligandos y receptores encontrada en el presente trabajo en colon, respecto a los demás sectores del intestino delgado. Las vías postuladas por las cuales las ETs producen la contracción mencionada, estarían relacionadas con varias de las rutas iniciadas por otros factores

extracelulares involucrados en la regulación de la organización de los filamentos de actina fibroblásticos (Ridley y Hall, 1994). Un rol clave parecen desempeñarlo dos de los clásicos segundos mensajeros celulares: el diacilglicerol y el inositol-1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>), producidos por hidrólisis del fosfoinositol-4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>). El diacilglicerol estimula la proteína quinasa C (PK-C) y los activadores farmacológicos de PK-C como los ésteres de forbol estimulan la reorganización de actina (Sobue y col., 1988; Ridley y Hall, 1992). De particular interés resulta el hecho que se ha demostrado que una isoforma de PK-C se localiza en las adhesiones focales (Jaken y col. 1989). IP<sub>3</sub> estimula la liberación de Ca<sup>2+</sup> de los reservorios intracelulares y la actividad de varias proteínas de unión a actina. *In vitro* han mostrado ser reguladas por la concentración mediada por Ca<sup>2+</sup> (Vanderkerckhove, 1990). *In vitro*, el PIP<sub>2</sub> se une a varias proteínas de unión a actina inhibiendo su interacción con ésta (Weeds y Maciver, 1993). Por lo tanto, se puede concluir que, alteraciones en los niveles de PIP<sub>2</sub> podrían modular la organización de actina *in vivo* (Stossel, 1989). Por otro lado, numerosos factores extracelulares podrían alterar la actividad de la adenilato ciclasa, promoviendo cambios en los niveles de AMPc y a la vez, modulando la actividad de la proteína quinasa A (PK-A). Los activadores de PK-A estimulan la distensión de la tensión de las fibras de los fibroblastos, sugiriendo que ésta sería otra vía de señalización involucrada en la organización de los filamentos de actina (Lamb y col., 1988). Finalmente, muchos factores extracelulares inducen la fosforilación de los residuos de tirosina de las proteínas y varios componentes de la adhesión focal pueden fosforilarse en estos sitios (Turner y Burridge, 1991; Bockholt y Burridge, 1993). En particular, la tirosina quinasa pp125FA, ha sido localizada en las adhesiones focales y se ha demostrado que se fosforila en respuesta a la unión de las células con fibronectina o por acción de la estimulación de bombesina u otros neuropéptidos (Schaller y Parsons, 1993). Un estudio más reciente ha demostrado que la vía por la cuál la ET-1 induce la contracción de fibras del citoesqueleto puede ser mediada por los complejos Gq/PCL y G12/PLC del sistema Rho/ROCK (Kawanabe y col., 2002).

Teniendo en cuenta el gradiente de distribución del péptido VIC/ET-2 (Fig. 37) y el rol postulado para el sistema de endotelinas en la mecánica de las vellosidades intestinales, se puede conjeturar que también en esta función el VIC/ET-2 funcione como factor paracrino que colabora en el sostenimiento del mayor esfuerzo mecánico y/o el sostenimiento de la contracción en los fibroblastos del extremo inferior de éstas estructuras; en forma cooperativa con la ET-1.

Otra de las propiedades mecánicas con las que se puede establecer un vínculo entre los fibroblastos y las ETs es la relacionada a la sensibilidad de las vellosidades. Se ha demostrado que la estimulación mecánica (por estiramiento o contacto) produce incremento intracelular de

Ca<sup>2+</sup> y evoca ondas intercelulares de este catión y liberación de ATP, en fibroblastos subepiteliales aplanados en cultivo sometidos a la acción de ETs, mientras que fibroblastos estrellados tratados con un análogo de AMPc (como el dBAMPc) y estimulados por contacto o por estiramiento no inducen tales efectos (Furuya y col., 2005). Por lo tanto, la supresión de las ondas de Ca<sup>2+</sup> en los fibroblastos estrellados sugiere una supresión de la liberación de ATP de las células estimuladas y/o supresión de la sensibilidad al ATP de las células vecinas.

El tratamiento con sustancia P, conocida por inducir incrementos de Ca<sup>2+</sup> pero no cambios morfológicos en fibroblastos subepiteliales, no promueven la recuperación de la liberación de ATP (Furuya y col., 1994). Asimismo, la respuesta de Ca<sup>2+</sup> a 10 μM de ATP disminuyó en un 40% en las células estrelladas tratadas con dBAMPc, recuperándose luego del tratamiento con ET-1 (Furuya y col., 2005). Estos resultados indican que la señalización intracelular mediada por AMPc causa cambios morfológicos que son acompañados por cambios en la mecanosensibilidad y sensibilidad al ATP. Podemos concluir así, que el VIC/ET-2 predominantemente localizado en la región inferior de las vellosidades, tendría un rol fundamental para mantener la morfología plana de los fibroblastos, capacitando a las vellosidades para responder a estímulos de estiramiento o presión mecánica.

*Rol de ETs en la mecanotransducción por ATP.* Finalmente, una última relación postulada para el diálogo entre los fibroblastos y el sistema de las ETs involucra al ATP en rutas de mecanotransducción de señales extracelulares en muchos tejidos y órganos (Burnstock, 2001).

Los fibroblastos que han adquirido el fenotipo aplanado, entre otros factores, por la acción de la ET-1 se tornarían sensibles a estímulos mecánicos y liberarían ATP (Furuya y col., 2005; Furuya y Furuya, 2007). Se ha demostrado que el tratamiento de los fibroblastos con un inhibidor de la quinasa Rho produce menor tensión de las fibras de actina de las células planas y disminución en su capacidad de liberar ATP. Esto indicaría, que la liberación de ATP por los fibroblastos requeriría de una contribución del citoesqueleto, tal como sucede en los astrocitos (Cotrina y col., 1998). Estos estudios demuestran que la organización del citoesqueleto es un requisito crítico para la propagación de la señales de calcio inducidas por ATP; reafirmando la importancia que tendría la morfología de los fibroblastos en este tipo de conducción y por ende, remarca el rol de las ETs.

Resumiendo, se puede afirmar que la interconversión de la forma celular fibroblástica puede alterar varias propiedades de las vellosidades, tales como el tamaño del entramado de la barrera de filtración, la tensión, la contractilidad y la sensibilidad mecánica. El fenotipo fibroblástico

cambia a lo largo del eje baso-apical de la vellosidad, estableciéndose un gradiente de fibroblastos aplanados-estrellados en este sentido, que otorga a las vellosidades una sensibilidad mecánica diferencial a lo largo de su eje mayor. La forma celular también cambia temporalmente por el gradiente de expresión específico de ETs, regulado por varios tipos celulares de las vellosidades. Por lo tanto, la sensibilidad mecánica de las vellosidades cambiaría local-, temporal- y dinámicamente en función de las condiciones del medioambiente celular, condicionando las funciones absortivas y defensivas del intestino.

*Rol de ETs en la apoptosis intestinal y en la renovación epitelial de las criptas.* Además de la localización específica en las vellosidades, también se detectaron cambios en la expresión de VIC/ET-2 a lo largo del eje longitudinal del intestino. Mientras que en el intestino delgado la señal de inmunomarcación fue más abundante en el borde basal que en el apical; en el colon, concordantemente con la desaparición de las vellosidades y el cambio de función del epitelio intestinal, se produce una inversión del patrón de expresión de este péptido. Una explicación para estos cambios en los niveles de expresión del VIC/ET-2 en el borde apical de las vellosidades del colon, podría estar relacionado con otro de los roles postulados para estos péptidos en el mantenimiento del epitelio del intestino grueso. Diversos estudios establecieron la existencia de diferentes patrones de apoptosis en las criptas intestinales, encontrándose que el 87% de las células apoptóticas se localizan en su tercio superficial (Moss y col., 1996; Shichiri y col., 1997; Shichiri y col., 1998; Merindo-Laborda, 2005). Asimismo, se demostró que la activación del receptor ET<sub>B</sub> en algunas patologías del colon puede inducir apoptosis (Nelson y col., 2005). Sumado a esto, Lauber y colaboradores mostraron que las células apoptóticas secretan factores quimioattractantes que estimulan la atracción de fagocitos (Lauber y col., 2003). Esto sugiere que la emisión de señales quimioattractantes por las células apoptóticas es uno de los mecanismos que asegura la eficiente y constante renovación del epitelio intestinal. Es posible entonces, que el VIC/ET-2 localizado principalmente en la superficie de las células epiteliales del colon pueda ser secretado por células apoptóticas, ejerciendo así una función de señalización de naturaleza quimioattractante para células fagocíticas como los macrófagos; o alternativamente, incrementa la onda apoptótica al sensibilizar los receptores ET<sub>B</sub>.

*Rol de ETs en la colitis ulcerativa crónica ideopática.* Analizados los posibles roles del VIC/ET-2 en la función normal de las vellosidades del intestino delgado y su notable cambio en la transición al intestino grueso, se indagó su rol en condiciones patológicas de este último segmento del tracto digestivo. En el presente estudio se observó que los niveles de expresión intestinal del péptido en el colon se incrementaron en animales con colitis ulcerativa crónica

ideopática inducida por DDS. Encontrándose señal inmunopositiva principalmente en el extremo superior de las vellosidades del colon. Moore y colaboradores reportaron que ante una lesión además de apoptosis se produce una condensación de microfilamentos, en los procesos citoplasmáticos de los fibroblastos subepiteliales y una contracción de la red de fibroblastos (Moore y col., 1989). Además, se ha reportado que los fibroblastos tendrían un importante rol en la respuesta a las lesiones producidas en la pared del intestino delgado y del colon (Powell y col., 1999a y 1999b). Por otro lado, por su ubicación puede decirse que los fibroblastos poseen una posición ideal para participar de los procesos de reparación epitelial.

La colitis ulcerativa inducida por DDS en el colon de ratones es un modelo experimental interesante, desarrollado para estudiar enfermedades intestinales humanas como la colitis ulcerativa crónica ideopática (Okayasu y col., 1990). Esta patología pertenece al grupo de Enfermedades Inflammatorias Intestinales, entre las cuales también está la enfermedad de Crohn y la colitis indeterminada. Se la suele calificar como una enfermedad autoinmune, cuyas causas específicas no han sido determinadas. Esta patología puede ser desencadenada tanto por factores ambientales como consecuencia de infecciones intestinales.

La sobreexpresión de VIC/ET-2 observada en los últimos estadios del tratamiento con DDS se produciría por liberación del péptido desde las células epiteliales, atravesando la membrana basal hacia la lámina propia, donde se encuentran varias células hematopoyéticas (Komuro, 1985; Toyoda y col., 1997; Hunyady y col., 2000). Asimismo, en el intestino las células epiteliales están prácticamente en contacto (unos 20 nm) con linfocitos, macrófagos y eosinófilos (Hashimoto y Komuro, 1988) y los fibroblastos subepiteliales muy próximos a los linfocitos y a las células dendríticas, las cuales actúan como presentadoras de antígenos (Toyoda y col., 1997). Por otra parte, se ha reportado que los fibroblastos del colon expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y en cultivo son capaces de estimular la proliferación de las células T del tipo CD4<sup>+</sup> (Saada y col., 2006). Estos datos en conjunto, indicarían que los fibroblastos subepiteliales podrían actuar como células presentadoras de antígenos, regulando la tolerancia a antígenos lumbinales (Saada y col., 2004). Dado los niveles de expresión en respuesta a la injuria, se especula que VIC/ET-2 podría actuar de forma sinérgica o cooperativa, es decir que su liberación conduciría al reclutamiento de los macrófagos hacia la lámina propia. Esta hipótesis se refuerza por la contribución de otros trabajos que demuestran que ET-2 actúa como factor quimioattractante de macrófagos (Grimshaw y col., 2002b). Adicionalmente, se sabe que las ETs actúan a otros niveles del sistema inmunitario, modulando el balance de las citoquinas Th1/Th2 en los mastocitos (Coulombe y col., 2002).

Se postula entonces, que VIC/ET-2 sería secretado por las células epiteliales del colon hacia la lámina propia y por las células epiteliales especializadas (células M) del FAE de las placas de Peyer hacia el folículo linfoide. Las placas de Peyer constituyen el principal sector de tejido linfoide organizado del sistema inmune y es el sitio inductor de inmunidad de la mucosa intestinal. Las células M del folículo asociado al epitelio transportan los antígenos particulados y solubles a través de la superficie epitelial por fagocitosis, permitiéndole llegar hasta la placa de Peyer (Sanz, 2001). Teniendo en cuenta esto, la acción del VIC/ET-2 (que exhibe inmunoreactividad en las células M que actuarían como presentadoras de antígenos) podría modular el sistema inmune para la defensa de la mucosa. Puesto que las células M en las placas de Peyer constituyen el centro inmunitario de la mucosa, el VIC/ET-2 en estas células podría tener un rol crítico en los mecanismos de presentación antigénica, actuando como quimioattractante de antígenos en las células M. Sin embargo, deberán realizarse estudios funcionales para corroborar estos postulados.

Muchas células del sistema inmune en la lámina propia (por ejemplo: mastocitos y macrófagos) producen ETs y expresan sus receptores (Ehrenreich y col., 1992; Yamamura y col., 1994). Además, estas células pueden secretar citoquinas capaces de regular la proliferación y migración celular, así como la respuesta secretoria de las células epiteliales (Valentich y col., 1997; Mifflin y col., 2002; Shao y col., 2006). En particular, la IL-1 estimula la producción de prostaglandina E2 vía un incremento en la expresión de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. Citoquinas que podrían ser moduladas por acción de las ETs (Coulombe y col., 2002). Asimismo, se ha reportado que los fibroblastos del colon activados por ILs, TNF y PMA secretan un amplio espectro de citoquinas (Rogler y col., 2001) y moléculas que degradarían la matriz extracelular (Andoh y col., 2005). Estos datos permiten especular que ésta estrecha y reciproca relación entre las células del sistema inmune, las ETs y los fibroblastos serían fundamentales en los procesos de inflamación. Confirmando esto, hay evidencias que sugieren que en una fase temprana de una lesión intestinal, la rápida contracción de los fibroblastos reduciría los déficits de la mucosa y disminuiría el área de la lesión que debe ser re-epitelizada (Moore y col., 1989). Se cree que los fibroblastos serían inducidos a proliferar, a migrar hacia la zona lesionada y a mediar la reparación de la lesión, secretando factores de crecimiento que actuarían directamente sobre la proliferación de las células epiteliales, la producción de proteínas de la matriz extracelular y metaloproteasas, permitiendo la remodelación del tejido (Jobson y col., 1998; McKaig y col., 1999). En los últimos años, Kernochan y colaboradores demostraron que los fibroblastos del colon en cultivo son capaces de contraerse e inducir migración hacia zonas lesionadas vía los

receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (Kernochan y col., 2002). Adicionalmente, se conoce que la ET-1 liberada durante una lesión intestinal estimula la contracción y migración de los fibroblastos del colon (Hogaboam y col., 1996; Murch y col., 1992), pero no su proliferación (Kernochan y col., 2002). Asimismo, se ha demostrado que del conjunto de sustancias que se liberan durante una lesión intestinal (IL-1, IL-6, IL-8, TNF); sólo la ET-1 produce contracción de los fibroblastos (Kernochan y col., 2002). Se observó que la ET-1 estimula un rápido incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en el colon, similar a lo observado en el duodeno (Furuya y col., 2005). Este dato sugiere que los fibroblastos del colon generan su fuerza de contracción por activación de miosina, análogamente a lo que sucede en las células del músculo liso intestinal.

Intentando modelizar los procesos de reparación de lesiones intestinales, se propone que durante la generación de una lesión de la mucosa intestinal, las células epiteliales y de la lámina propia liberarían el péptido VIC/ET-2, a la zona lesionada rica en numerosos mediadores de inflamación. Éste péptido rápidamente estimularía la contracción de los fibroblastos subepiteliales, provocando un rápido cambio del tamaño de la lesión. Adicionalmente, VIC/ET-2 y otras ETs estimularían la migración de los fibroblastos hacia la lesión, donde otros mediadores de la inflamación incluyendo el PDGF inducirían la proliferación fibroblástica. El aumento de la población de fibroblastos mediaría el proceso de reparación gracias a la secreción de componentes de matriz extracelular y de factores de crecimiento epitelial (Kernochan y col., 2002).

*Rol de las ETs en piel.* Como se indicó previamente, otra de las contribuciones importantes del presente trabajo fue la detección de los ARNms para VIC/ET-2 en piel. La expresión de dicha molécula se comparó con el resto de los ARNms para ET-1, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (Adur y col., 2004; Adur y col., 2007). Si bien los roles fisiológicos de las ETs en células epidérmicas han sido estudiados previamente analizando su relación con la producción, proliferación y diferenciación en los queratinocitos y melanocitos (Bull y col., 1991; Knock y col., 1993; Yohn y col., 1993; Tsuboi y col., 1995; Imokawa y col., 1995; Hara y col., 1995; Yoshida y col., 1996; Reid y col., 1996; Hirobe, 2001; Hachiya y col., 2002; Mou y col., 2004; Aoki y col., 2005), hasta el desarrollo del presente trabajo la información sobre la expresión del sistema completo de ETs en piel era muy escasa. Los resultados aquí hallados demuestran por primera vez la importancia de la expresión en piel del gen para el péptido VIC/ET-2 (Adur y col., 2003).

Aunque no se observaron diferencias significativas, la expresión de ARNm para VIC/ET-2 resultó superior a la de ET-1, mientras que la expresión de ARNm para ET<sub>A</sub> fue superior que para ET<sub>B</sub> (Adur y col., 2003). Los estudios inmunohistoquímicos de la piel mostraron que la

expresión de los péptidos para los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> exhibía una fuerte señal, tanto en la capa epidérmica como en la dérmica. En el presente trabajo se reporta por primera vez que el VIC/ET-2, se halla ampliamente distribuido en los queratinocitos de la piel murina (Adur y col., 2007). Dada la relativa abundancia de las ETs en este órgano; se hipotetizó que las ETs podrían desempeñar algún/nos rol/es específico/s en los procesos de defensa del organismo.

La piel, como primera barrera defensiva está sometida a la acción de diferentes agentes químicos, físicos y mecánicos. Por ello, siendo las radiaciones ultravioletas uno de los principales agentes responsables de las patologías de este órgano, se realizó un análisis de la respuesta de las ETs en la piel murina, cuando ésta es sometida artificialmente a radiación ultravioleta, con el fin de evaluar su rol inductor de reparación epitelial. Es ampliamente sabido que las radiaciones UV influyen el establecimiento de los fenotipos epidérmicos y dérmicos, la tasa de proliferación y la organización arquitectónica de esta barrera defensiva. Las ETs y su comportamiento frente a diferentes mecanismos de agresión de la piel han sido extensivamente estudiadas. Entre los reportes más recientes se han analizado lesiones epidérmicas (Demunter y col., 2001), seborrea (Manaka y col., 2001), inflamación dérmica (Trentin y col., 2006), vitiligo (Abdel-Naser y col., 2006; Kim y col., 2007), melanomas (Kikuchi y col., 1996; Demunter y col., 2001; Eberle y col., 2002; Lahav y col., 2004; Mangahas y col., 2005; Spinella y col., 2007) y cánceres no melanómicos (Zhang y col., 2006).

Desde hace unos años se ha demostrado que la sobreexposición a la radiación ultravioleta se asocia a la propensión al cáncer de piel (Parrish, 1993). La exposición a la luz solar está fuertemente implicada en la etiología de los melanomas malignos cutáneos y la región del espectro correspondiente al UV sería la responsable de dichas patologías. Recientemente se reportó la expresión génica de ET-1, la ET-3 y sus receptores, luego de ser irradiadas por radiación UV-B y/o UV-A (De Fabo y col., 2004; Hachiya y col., 2004; Berking y col., 2004; Brenner y col., 2005). En función de estos antecedentes y puesto que hasta el momento no se conocen estudios comparativos y cuantitativos sobre la expresión génica del VIC/ET-2 y los otros miembros del sistema ETs usando radiación UV-A, UV-B y UV-C, se analizaron aquí por primera vez en un modelo animal los efectos de todo el rango de radiación UV sobre la expresión de las ETs en piel.

En modelos *in vitro*, similares a los aquí estudiados, se demostró que la radiación UV-A inhibe la expresión de ET-1, mientras que la radiación UV-B incrementa la producción de ET-1 (Brenner y col., 2005). Similares resultados fueron reportados por otros grupos (Imokawa y col., 1995; Tsuboi y col., 1995; Pernet y col., 2000). Otros trabajos reportan que la radiación UV-A

incrementa la expresión de la ET-1 (Tsuboi y col., 1994; Phillipson y col., 2002). En relación al VIC/ET-2, Murakami y colaboradores demostraron que la expresión génica disminuye en los queratinocitos expuestos a radiación UV-B (Murakami y col., 2001). Las discrepancias con respecto a la expresión de ET-1 pueden atribuirse al uso poco riguroso de diferentes fuentes artificiales de UV, con diferentes espectros y diferentes dosis (Yarosh y col., 1999). Para minimizar estos problemas, en esta tesis se diseñó cuidadosamente el protocolo de irradiación. En principio, se utilizó el mismo tipo de lámpara para cada una de las diferentes longitudes de onda irradiadas. En estas condiciones, *in vivo* se detectó que tanto la radiación UV-A como la UV-B promueven el aumento de la expresión de ARNm para ET-1 y la inhibición de ARNm para VIC/ET-2. La radiación UV-C provocó la inhibición de la expresión génica de la ET-1 y el incremento de los niveles del ARNm y del péptido VIC/ET-2 en los queratinocitos de la epidermis de neonatos (Adur y col., 2007).

Por primera vez se presentan aquí resultados que abonan la hipótesis de un rol defensivo de VIC/ET-2 frente a la radiación UV-C. En estos estudios, se verifica que la piel expuesta a radiación UV-C provoca incrementos en la expresión de VIC/ET-2. El estudio temporal mostró que la expresión de VIC/ET-2 disminuye a las 24 hs post-irradiación, verificándose un pico una hora después de la misma, comportamiento que se repite en el caso de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. Utilizando el mismo modelo, Ahn y colaboradores encontraron incrementos significativos de la ET-1 y sus sitios de unión por la exposición de la piel a niveles de radiación UV-B capaces de causar daños epidérmicos (Ahn y col., 1998). Utilizando *microchips* de ADN, Murakami y colaboradores demostraron que los queratinocitos expresan varios tipos de citoquinas al ser irradiados con UV-B y como en el caso de VIC/ET-2, su expresión también se atenúa a las 24 hs post-irradiación (Murakami y col., 2001).

Resumiendo, se demostró *in vivo* que los queratinocitos expresan el péptido VIC/ET-2 al ser expuestos a radiación UV-C, postulándose un rol reparador en este órgano. A su vez, los queratinocitos serían las principales células diana de la radiación UV en la piel.

Se conoce, que los queratinocitos pueden ser activados por estímulos del medio ambiente como las radiaciones ultravioletas (Kondo, 1999). *In vitro*, estas células producen una gran variedad de citoquinas y factores de crecimiento que pueden afectar la respuesta inmune, así como también el crecimiento y diferenciación de los queratinocitos y otras células de la piel como los melanocitos, vía mecanismos autocrinos o paracrinos (Yada y col., 1991; Birchall y col., 1991; Kondo, 1999; Hachiya y col., 2004; Brenner y col., 2005). Las ETs, en su rol de citoquinas, son liberadas por los queratinocitos al ser expuestos a radiación ultravioleta. Particularmente, la radiación UV-B a

través del daño sobre el ADN tendría un rol esencial disparando la producción de citoquinas (Nishigori y col., 1996). Asimismo, se ha postulado que este tipo de moléculas regularía reacciones inflamatorias y de inmunosupresión en la piel expuesta a radiación UV (Nishigori y col., 1996; Petit-Frère y col., 1998; Skov y col., 1998). Adicionalmente, se conoce que las radiaciones UV-A y/o UV-B inducen en la piel, por un mecanismo mediado por citoquinas, la producción de proteínas de la matriz extracelular, necesarias para la remodelación/repación dérmica (Kossodo y col., 2004). En este trabajo, los queratinocitos expuestos a radiación UV-A y UV-B sobreexpresaron el gen ET-1; postulándose que ésta a su vez, estimularía a los melanocitos vecinos. La radiación ultravioleta provoca en los queratinocitos, una liberación diferencial de citoquinas, dependiendo del tipo de longitud de onda. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\alpha$ , son sobreexpresadas en los queratinocitos ante la exposición a la radiación UV-B. El TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\alpha$  se cree inhibirían en los melanocitos la síntesis de melanina y su proliferación (Swope y col., 1991). Sin embargo, IL-1 estimularía la secreción por los queratinocitos de factores melanogénicos como ser la ET-1 (Funasaka y col., 1998). Por su parte la radiación UV-A inhibe la producción de la IL-6 y el TNF, pero estimula la expresión de la IL-12 que activa las células *T-helper* (Kondo y Jimbow, 1998; Kondo, 1999).

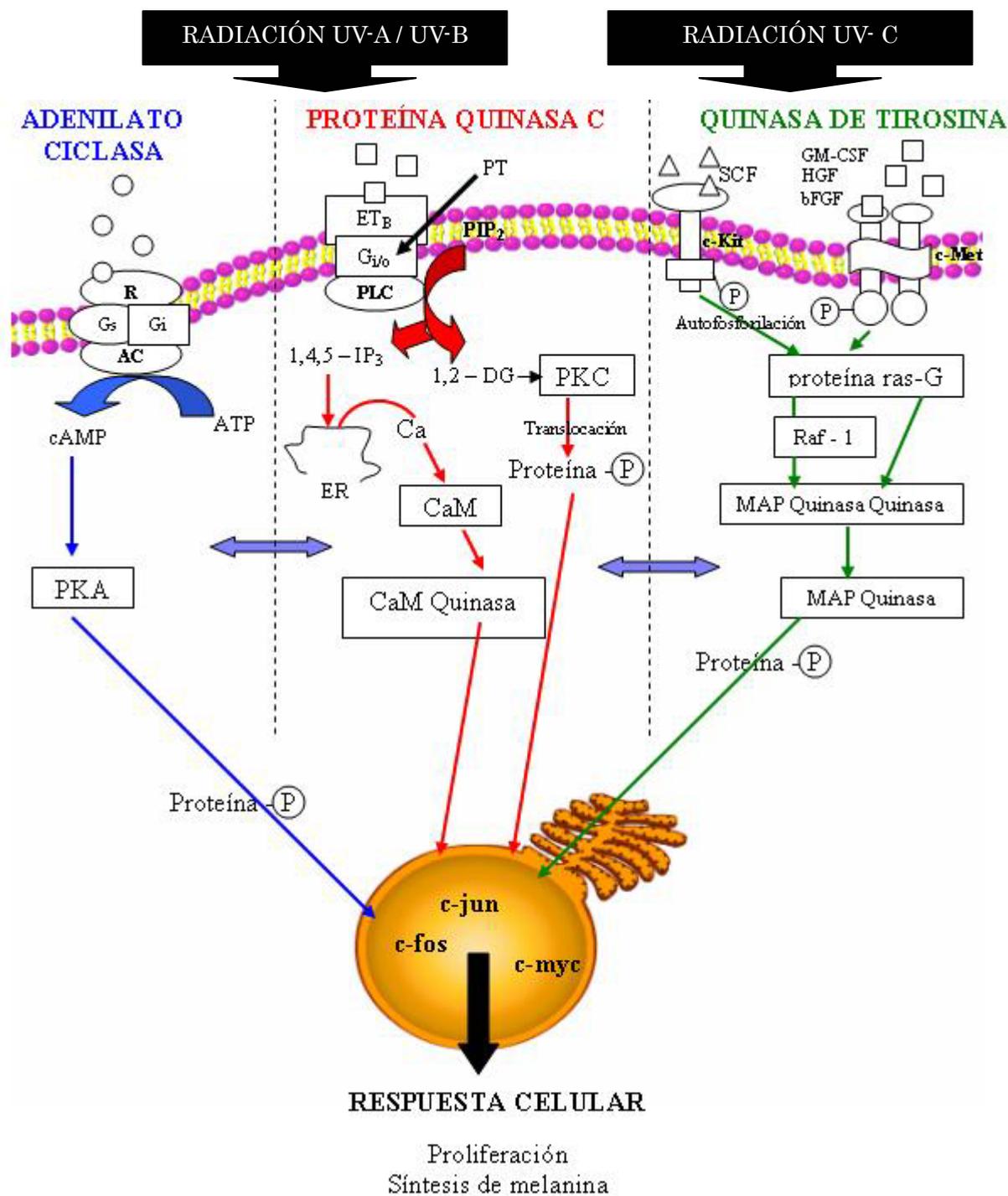
En contraste con los otros tipos de radiación UV, la radiación UV-C no ha sido muy explorada en la bibliografía. Esto se debe al hecho que estas longitudes de onda son filtradas por la capa de ozono. No obstante, teniendo en cuenta las evidencias discutidas previamente y la importancia que adquiere este tipo de radiación por el incremento de la utilización de fuentes artificiales de luz ultravioleta y la modificación de la capa de ozono (Andersen y col., 2006; Aucamp, 2007; Kovács y col., 2007; Patil y col., 2007), se consideró crítico evaluar el posible rol preventivo de las ETs frente a la radiación UV-C. En las experiencias realizadas se observó que los queratinocitos de la epidermis expresan normalmente VIC/ET-2, el que se incrementa, en respuesta a la radiación UV-C. Similar respuesta poseen ambos receptores, aunque en mayor proporción el ET<sub>A</sub>. Paralelo a este incremento, se registró un aumento dosis-dependiente del número de queratinocitos y del espesor de la epidermis. Estas evidencias sugieren que la epidermis expuesta a radiación UV-C promovería una proliferación y diferenciación de las células epiteliales epidérmicas. Usando calcio como promotor de diferenciación de queratinocitos, Kotake-Nara y colaboradores verificaron que el péptido VIC/ET-2 era sobreexpresado en paralelo con las proteínas involucrina y transglutaminasa postuladas como marcadores de diferenciación de éstas células, sugiriendo así su rol en este proceso (Kotake-Nara y col., 2007). Previamente, Kotake-Nara y colaboradores demostraron sobreexpresión de

VIC/ET-2 durante la diferenciación de células PC12 inducida por cloruro de cobalto (Kotake-Nara y col., 2005).

No obstante, el hecho de que UV-C eleve los niveles de expresión de ARNm para VIC/ET-2, mientras que la UV-A y UV-B no, puede explicarse por cascadas de señalización de expresión dependientes de la longitud de onda de la radiación. Estudios previos han mostrado que la radiación UV-C direcciona una vía de transducción al núcleo, que es en largos tramos idéntica a la inducida por numerosos factores de crecimiento (Devary y col., 1992; Radler-Pohl y col., 1993; Sachsenmaier y col., 1994). Esta vía involucra a las quinasas Ras y Raf, Src y MAP, intermediarios de las rutas de señalización de los genes *c-fos*, *c-jun* y *Fos-Jun*. Los estudios de Schmidt y colaboradores reportaron que la diferenciación de los queratinocitos inducida por calcio está asociada con una rápida y pasajera activación de la vía Raf/MEK/ERK (Schmidt y col., 2000). Recientemente, Kotake-Nara y colaboradores demostraron que VIC/ET-2 vía ROCK (*Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase*) regularía a la transglutaminasa-1 en la diferenciación de los queratinocitos de ratón (Kotake-Nara y col., 2007).

En función de los datos discutidos precedentemente, se postula una posible vía de señalización intracelular desencadenada por la radiación UV-C, la que, por medio de VIC/ET-2 induciría la diferenciación de los queratinocitos (Figura 38). En la misma y a modo de comparación se presentan las vías de señalización intracelular postuladas para las radiaciones UV-A y/o UV-B, las cuales por medio de la ET-1 inducirían procesos mitogénicos y melanogénicos en los melanocitos.

Coincidente con los resultados obtenidos por Imokawa y colaboradores (Imokawa y col., 1995), el incremento de ET-1 y sus receptores obtenido en el presente trabajo post-irradiación UV-B, así como el incremento de VIC/ET-2 y sus receptores post-irradiación UV-C y sumado a que la ET-1 y el VIC/ET-2 presentan similar selectividad por los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, se sugiere que VIC/ET-2 y ET-1 podrían actuar cooperativamente regulando cambios fisiológicos similares o complementarios en la piel expuesta tanto a radiación solar como a fuentes artificiales.



**Figura 38:** Vías de señalización intracelulares para la radiación UV-A, UV-B y UV-C. En azul, vía PKA de la Adenilato Ciclasa; en rojo, vía PKC de la Fosfolipasa C y en verde, vía de la quinasa de Tirosina. CaM: Calmodulina, PT: Toxina Pertusis, PLC: Fosfolipasa C, AC: Adenilato Ciclasa, PKC: Proteína quinasa C, PKA: Proteína quinasa A, MAP quinasa: Proteína quinasa activadora de mitogénesis. (Modificado de Imokawa y col., 1997)

**Rol de ETs en pulmón.** Mientras que los niveles de ARNm para ET-1 y VIC/ET-2 en el pulmón murino no evidenciaron niveles significativamente diferentes que los detectados por otros investigadores (Rosengurt y col., 1990; Henry, 1993; Uchide y col., 1999), los de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> fue sorprendentemente la máxima encontrada para todos los órganos estudiados. Estudios previos demostraron que los transcritos de ambos receptores se hallaban expresados en los vasos pulmonares, en las vías aéreas y en los alvéolos (Hay y col., 1993; Noguchi y col., 1993, Battistini y col., 1994). Como en otros órganos, la distribución difiere según la especie. La expresión de ARNm para ET<sub>B</sub> fue ocho veces superior a la de ET<sub>A</sub>, lo que podría deberse a que numerosos roles fisiológicos y patológicos como la modulación del tono vascular pulmonar (Ivy y col., 2001), la del desarrollo de hipoxia crónica en la hipertensión pulmonar (Muramatsu y col., 1999) y en la hipertensión pulmonar (Dupuis y col., 2000) de la ET-1, son mediados vía ET<sub>B</sub>. Asimismo y como sucede en el cerebro, en el pulmón también es importante la expresión de ET-3 (Eddahibi y col., 1993; Uchide y col., 1999; Uchide y col., 2000a; Uchide y col., 2001a). Algunos estudios funcionales han aportado nuevos datos sobre la acción de la ET-1 y sus receptores en los daños producidos en el tejido pulmonar inducidos por compuestos ácidos e hiperventilación (Guimarães y col., 2002; Habre y col., 2006) y en la fibrosis pulmonar (Shi-Wen y col., 2006). Por otro lado, al presente se desconoce un rol específico del péptido VIC/ET-2 en pulmón. El bajo nivel de expresión encontrado en los animales adultos evaluados, permite sugerir que este péptido no cumpliría un rol muy relevante en este órgano, aunque como se comentará más adelante poseería roles determinantes durante el desarrollo. Por tanto, deberán realizarse estudios complementarios para intentar dilucidar posibles funciones en animales adultos.

**Rol de ETs en cerebro.** Como sucede en pulmón, mientras los niveles de ARNm para ETs en cerebro murino no muestran diferencias con los hallados por otros investigadores (Uchide y col., 1999; Masuo y col., 2003), la expresión de ET<sub>B</sub> es 40 veces mayor a la de ET<sub>A</sub>. Ogawa y colaboradores demostraron en humanos que la expresión del ARNm para ET<sub>B</sub> es elevada en cerebro (Ogawa y col., 1991). En la misma época, se descubrió que ET-3 es la isoforma predominante en el sistema nervioso (MacCumber y col., 1990; Levin y col., 1991; Shiba y col., 1992), particularmente en el hipotálamo y en el cerebelo (Matsumoto y col., 1989; Yoshizawa y col., 1990). Estudios posteriores, encontraron además que ET-1 también se expresa en cerebro (MacCumber y col., 1990; Sakurai y col., 1990; Nakagomi y col., 2000; Uchide y col., 2000a; Uchide y col., 2001a). Recientemente, Naidoo y colaboradores utilizando anticuerpos específicos localizaron el receptor ET<sub>A</sub> en nueve regiones del cerebro humano y el receptor ET<sub>B</sub> en 24

regiones, confirmando que las ETs se expresan y procesan en el cerebro humano (Naidoo y col., 2004). Por otro lado, Wu y colaboradores utilizando RT-PCR en tiempo real demostraron la presencia de ET-1 y principalmente de ET-3 en células de la microglía dentro del cuerpo calloso del cerebro de ratas recién nacidas (Wu y col., 2006). Asimismo, estudios recientes han evaluado los posibles roles fisiológicos y patológicos mediados vía el receptor ET<sub>B</sub>. Anguelova y colaboradores demostraron que el receptor ET<sub>B</sub> se halla selectivamente expresado en ciertos tipos de tumores cerebrales (Anguelova y col., 2005). Además, importantes relaciones y vías de señalización activadas por el óxido nítrico mediadas por la ET-3 y el receptor ET<sub>B</sub> han sido propuestas en estudios sobre cerebro de rata (Rodríguez y col., 2005; Morgazo y col., 2005).

Estos datos permiten explicar la preponderancia del ARNm para receptor ET<sub>B</sub> en este órgano. Recientemente, Tsang y colaboradores describieron la distribución espacio-temporal del ARNm para prepro-ET-1 por hibridación *in situ* en cerebro de ratones neonatos y adultos (Tsang y col., 2005). Sin embargo, exceptuando los estudios del grupo, no existen muchos datos sobre los roles de VIC/ET-2. Se encontró que la expresión de VIC/ET-2 es alta en la glándula pituitaria y en la médula oblonga tanto en rata como en ratones y que su distribución no se correlaciona con la de ET-1, postulándose que ambos genes podrían estar involucrados en la muerte celular neuronal promovida por injuria térmica (Masuo y col., 2003). No obstante estos estudios preliminares, deben realizarse experimentos adicionales para definir el rol específico del VIC/ET-2 en este órgano.

### **V.3.- ROL DEL SISTEMA DE LAS ETs DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO**

Finalmente en una segunda etapa, y una vez establecidos los niveles de expresión de los ARNMs para VIC/ET-2 y ET-1 y para los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, se realizó un estudio cuantitativo sobre la expresión del sistema durante el desarrollo embrionario de esta misma especie.

Puede postularse que las ETs y sus receptores son componentes esenciales en el desarrollo de varios tejidos normales. Trabajos realizados utilizando ratones deficientes en el sistema de las ETs, mostraron que los animales homocigotas deficientes en la expresión de ET-1 mueren al nacer exhibiendo anomalías craneofaciales, malformaciones del arco aórtico y defectos en el tabique ventricular (Kurihara y col., 1995). Por otro lado, ratones deficientes para el receptor ET<sub>A</sub> también mostraron este tipo de deformaciones y defectos en el circuito sanguíneo, atribuidos a la interrupción en el desarrollo de la cresta neural cefálica y cardíaca respectivamente (Clouthier y col., 1998). Otros estudios realizados en ratones deficientes en ET-3 o ET<sub>B</sub> mostraron distensión intestinal (megacolon) y pigmentación puntiforme en el pelaje (Hosoda y col., 1994;

Garipey y col., 1996; Auricchio y col., 1996; Kusafuka y col., 1997). Estas observaciones están relacionadas con el deficiente desarrollo de las neuronas ganglionares intestinales y los melanocitos de la epidermis respectivamente.

Se ha establecido un rol particularmente esencial en relación con la vía que involucra ET-3/ET<sub>B</sub>. Estudios previos de nuestro grupo, mostraron un similar patrón de expresión de ARNm para ET-3 y ET<sub>B</sub> durante el desarrollo embrionario, sugiriendo que ambas moléculas participan en el desarrollo ontogénico murino en los últimos estadios de su desarrollo (posteriores a E11) (Uchide y col., 1999). Estudios recientes, confirman la importancia de las ETs en el desarrollo. Se ha postulado que la ET-3 tendría un rol crucial en el mantenimiento de múltiples genes progenitores de la inervación intestinal, actuando en la proliferación, migración y diferenciación de las células de la cresta neural (Bondurand y col., 2006; Nagy y Goldstein, 2006). Se ha demostrado la importancia de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> y de la ET-1 en el desarrollo de la dentición normal en rata (Neuhaus y Byers, 2007). Adicionalmente, se ha postulado el requerimiento de niveles normales de ET-1/ET<sub>A</sub> en la vía que conduce al desarrollo del ectodermo facial, para el desarrollo del patrón esquelético en la cresta neural de las células del pez cebra (*zebrafish*) (Nair y col., 2007).

Los estudios ontogénicos aquí presentados demostraron que la familia de las ETs (VIC/ET-2 y ET-1) intervendría en la morfogénesis de pulmón, intestino y piel en el ratón, alcanzando altos niveles de ARNms hacia los últimos estadios del desarrollo embrionario y al momento del alumbramiento o inmediatamente después de la ocurrencia de dicho evento (Uchide y col., 2002; Adur y col., 2003). En particular, los receptores exhibieron al momento del alumbramiento un incremento de sus ARNms del orden de 3 a 4 veces comparado con el estadio embrionario E14 (Adur y col., 2003). En estudios previos, Chan y colaboradores encontraron que la expresión de la ET-1 comienza a incrementarse fuertemente en corazón, pulmón, ojo, oído, estómago e intestino hacia los últimos estadios del desarrollo (Chan y col., 1995). Similares resultados fueron hallados por Uchide y colaboradores y reforzados y complementados en el presente trabajo (Uchide y col., 1999; Uchide y col., 2002; Adur y col., 2003). A su vez, este estudio demuestra que durante todas las etapas del desarrollo evaluadas, los niveles de ARNms para VIC/ET-2 fue mayor a la de ET-1 en intestino y piel, mientras que en pulmón se incrementan los niveles de ARNms de los ligandos y de los receptores inmediatamente después del nacimiento (Uchide y col., 2002; Adur y col., 2003) lo que permite postular importantes funciones para ET-1 y VIC/ET-2 en pulmón durante el desarrollo. Estos péptidos participarían en los cambios funcionales, vía la alteración de la circulación pulmonar a través de la regulación del tono

vascular (Cassin y col., 1991; Hislop y col., 1995). Así, los estudios aquí presentados permiten sugerir que la actividad funcional de estos péptidos a nivel pulmonar sería desencadenada inmediatamente después del nacimiento. Resultados similares a los aquí presentados fueron reportados recientemente (Levy y col., 2005). Estos autores demostraron que las ETs y los factores de crecimiento endoteliales tienen un rol crítico en el desarrollo del tono vascular y la proliferación celular.

*Rol de ETs en el desarrollo pulmonar.* Analizando el comportamiento de ligandos y receptores durante el desarrollo del pulmón, puede sugerirse que VIC/ET-2 en este órgano tiene un rol complementario o vicariante con ET-1. Por lo tanto, es posible que en pulmón ambos genes estén regulados por mecanismos similares y que evolutivamente el rol de VIC/ET-2 haya ido siendo progresivamente relegado por ET-1, lo que se confirmaría por el escaso contenido de ARNm para VIC/ET-2 encontrado en adultos. El análisis de los transcritos de ET-1 y ET-2/VIC 24 hs después del nacimiento muestra un comportamiento muy similar, particularmente en relación con la tendencia al incremento inmediatamente después del parto. Estos resultados, confirman los estudios realizados por otro grupo (Poiiock, 1998), sugiriendo que el sistema de las ETs tendría un rol clave en la maduración pulmonar, probablemente estimulada por la exposición al oxígeno atmosférico. Soportando esta hipótesis, Ambalavanan y colaboradores encontraron en neonatos de ratón que la hipoxia atenúa el patrón normal de expresión de la ET-1 luego del parto (Ambalavanan y col., 2007).

*Rol de ETs en el desarrollo intestinal.* En este trabajo, los niveles de ARNm para VIC/ET-2 se incrementaron progresivamente desde el estadio embrionario E14 hasta alcanzar su pico máximo inmediatamente después del alumbramiento; evidenciando un patrón de incremento paralelo a la formación de las vellosidades intestinales. Se sabe que las vellosidades intestinales en el ratón se forman en los últimos estadios embrionarios (posteriores al estadio E14) (Uchide y col., 2002). Estudios previos, discutidos previamente *in extenso*, han demostrado que las ETs cumplirían un rol importante en la transducción de señales intercelulares en las vellosidades intestinales, similares a las reportadas en los astrocitos (Giaume y col., 1992; Bloomstrand y col., 1999; Ehrenreich, 1999).

A partir de estos resultados, así como los encontrados en el intestino murino adulto se hipotetiza que VIC/ET-2 puede tener un rol clave en la formación de las vellosidades intestinales antes del nacimiento y en su función en la vida postnatal y adulta. Estas suposiciones están soportadas adicionalmente por el hecho de que tanto ET-1 como VIC/ET-2 en menor medida, se expresan en la lamina propia del intestino, estructura clave en la morfogénesis y en la fisiología de las

vellosidades intestinales (de la Monte y col., 1995).

*Rol de ETs en el desarrollo de la piel.* En la presente tesis se demostró que luego del alumbramiento se produce un incremento en la expresión del sistema ETs tanto a nivel transcripcional (ARNms para VIC/ET-2, ET-1, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>) como traduccional (VIC/ET-2, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>) (Adur y col., 2003).

Se ha demostrado que ET-1 y ET-3 se expresan en la piel de embriones al inicio del proceso de pigmentación, evento que en los melanocitos comienza a verificarse en el estadio E16 y se incrementa drásticamente luego del alumbramiento (Hirobe, 1984). Estudios en animales en los que se bloqueó el sistema ET-3/ET<sub>B</sub> demostraron que la vía de señalización ET-3/ET<sub>B</sub> es fundamental para el desarrollo de los melanocitos (Hosoda y col., 1994). Posteriormente, se demostró que ET<sub>B</sub> es el principal receptor del sistema de ETs en el desarrollo de los melanocitos durante la embriogénesis (Reid y col., 1996). Yoshida y colaboradores demostraron que ET-3 participa en diferentes procesos durante el desarrollo de los melanocitos, fundamentalmente en su migración hacia la dermis (Yoshida y col., 1996). Recientemente, Aoki y colaboradores confirmaron la necesidad de la cooperación entre la ET-3 y los receptores de la tirosina quinasa en el desarrollo de los melanocitos (Aoki y col., 2005). Pla y Laure demostraron que el desarrollo de las células de la cresta neural cardíaca y craneal requiere del desarrollo del complejo ET<sub>A</sub>/ET-1 para ser completamente funcionales; mientras que las células de la cresta neural de las regiones vagas y troncales requieren del complejo ET<sub>B</sub>/ET-3. En este mismo trabajo se postula el rol de éste último complejo en el desarrollo de los melanocitos (Pla y Larue, 2003).

Teniendo en cuenta los antecedentes previos y los estudios desarrollados en esta tesis, puede sostenerse que el sistema de las ETs tendría un rol importante durante el desarrollo de la piel murina. Sin embargo, al presente no existen trabajos que demuestren específicamente los niveles de expresión o localización del VIC/ET-2 durante las fases tempranas del desarrollo de la piel. Los resultados preliminares aquí obtenidos permiten hipotetizar que el VIC/ET-2 vía sus receptores, participaría activamente durante la organogénesis tardía. Fundamentalmente, ha podido probarse en procesos iniciados durante los últimos estadios del desarrollo (posteriores a E15). No obstante, serán necesarios estudios complementarios utilizando hibridación *in situ*, IHQ y otros para comprender el complejo rol de este péptido en este órgano.

Contrastando con lo observado a nivel de pulmón; intestino y piel; los niveles de ARNms para las ETs en otros órganos estudiados se mantuvo constante. Este comportamiento muestra que las ETs son espacio-temporalmente reguladas durante el desarrollo murino. Sin embargo, estudios

complementarios deberán realizarse para explicar estos mecanismos de regulación. Modelos de ratones deficientes en VIC/ET-2 (aún no desarrollados) adicionales a los desarrollados para ET-1 (Kurihara y col., 1995; Neuhaus y Byers, 2007; Nair y col., 2007) serán de gran utilidad para comenzar a comprender estos mecanismos.

Del análisis del conjunto de resultados obtenidos en los órganos en desarrollo se infiere que los cambios más drásticos en el sistema ETs se producen en pulmón e intestino, lo que podría atribuirse fundamentalmente a que estos órganos están sometidos a los cambios fisiológicos más significativos en la adaptación a la vida extra-uterina. En este período comienza a establecerse la mecánica respiratoria autónoma y a producirse la absorción de nutrientes por vía oral; lo cuál sugestivamente se acompaña de un significativo incremento del sistema de endotelinas.

## VI - RESUMEN

Este trabajo se ha centrado en el estudio de las endotelinas, principalmente en el péptido Vasoactivo de Contracción Intestinal (VIC/ET-2). Las endotelinas pueden considerarse como los factores vasoconstrictores endógenos más potentes y de efecto más prolongado descritos hasta el momento. Estas moléculas de 21 aminoácidos, a pesar de haber sido estudiadas en profundidad, presentan aún hoy parcialmente definidos sus roles fisiológicos. La mayoría de las dificultades encontradas en el estudio de sus funciones, se debe al hecho de que exhiben una amplia variabilidad en su distribución, en los diferentes órganos de las diferentes especies. El objetivo de esta tesis consistió en aportar nuevos datos que permitan ayudar a profundizar la comprensión y dilucidación de los roles de estos péptidos.

Para dilucidar los roles del gen VIC/ET-2, se planteó y realizó un trabajo integral sobre la distribución celular del ARNm de VIC/ET-2 en varios tejidos de animales adultos y a través de los diferentes estadios del desarrollo embrionario del ratón constituyendo el primer trabajo que presenta un estudio cuantitativo y comparativo, abordando la expresión génica de varios de los miembros del sistema endotelina. El análisis aquí presentado permitió identificar los órganos y los estadios del desarrollo donde se expresa preponderantemente el gen VIC/ET-2.

Comparada con la expresión de la ET-1 y los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, la expresión del VIC/ET-2 en animales adultos se limitó a unos pocos órganos. La expresión fue especialmente importante en intestino ovario, útero y piel. Durante el desarrollo, se demostró que la familia de las ETs alcanza altos niveles de expresión, hacia los últimos estadios del desarrollo embrionario y al momento del parto o inmediatamente después de la ocurrencia de dicho evento en intestino, pulmón y piel. Cambios que estarían relacionados al hecho de que precisamente en estos órganos se producen los cambios fisiológicos más significativos para adaptarse a la vida extra-uterina (comienzo de la respiración, absorción de nutrientes y el contacto con nuevos agentes físico-químicos).

Del análisis particular sobre modelos experimentales específicos para intestino y piel; se demostró que en el intestino, el VIC/ET-2, adicionalmente a las funciones de contracción – relajación se ha postulado que este sistema estaría implicado en la regulación de la función de tamiz / barrera, en los procesos de movilidad y en la mecanosensibilidad de las vellosidades intestinales. Regulación que se efectuaría teniendo como blanco de acción a los fibroblastos subepiteliales y de la lámina propia. Además, se postula que el VIC/ET-2 es secretado desde la membrana basal de las células epiteliales, actuando como un quimioatrayante para el

reclutamiento de macrófagos hacia la lámina propia, modulando la función de las células inmunitarias en la defensa de la mucosa. Finalmente se confirmó que VIC/ET-2 y sus receptores son activados ante la exposición a la radiación ultravioleta de longitud de onda corta (UV-C); secretado desde la epidermis, actuaría como un factor paracrino para el crecimiento de los melanocitos y para la melanización y como un factor autocrino en el crecimiento de los queratinocitos.

De la evaluación del conjunto de evidencias aquí presentadas, se puede concluir que el péptido Vasoactivo de Contracción Intestinal además de sus funciones sobre el tracto gastrointestinal participaría en múltiples roles fisiológicos en otros sistemas. Principalmente durante el desarrollo embrionario y en la activación de los mecanismos protectores ante radiación ultravioleta. Roles, realizados vía sus receptores, de una manera autocrina y/o paracrina.

## VI - ABSTRACT

The present work is centered in the study of the endothelins, essentially in the Vasoactive Intestinal Contractor (VIC) peptide. Endothelins can be considered the most potent and long-term effect endogenous vasoconstrictors described up to date. Even though these 21-amino acid molecules have been thoroughly studied, their physiological roles remain partially understood. Most of the difficulties encountered in the study of their functions are due to the fact that they exhibit great variability in their distribution in different organs, in diverse species. The objective of the present thesis was to provide new data that enabled a deeper comprehension and the elucidation of the roles these peptides play.

In order to elucidate the roles of the VIC/ET-2 gene, an integral study on the cellular distribution of VIC/ET-2 mRNA in various adult-animal tissues and in different stages of embryony development of mice was designed and performed, providing the first work to include a quantitative and comparative study of the genetic expression of various members of the endothelin system. The analysis presented permitted the identification of the organs and developmental stages in which VIC/ET-2 gene expression predominates.

Compared to the expression of ET-1, and ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors, VIC/ET-2 expression in adult animals was limited to few organs. Expression was especially important in intestine, ovary, uterus and skin. We demonstrated that ET-family members reach high expression levels in intestine, lung and skin during the last stages of embryony development and at and immediately after birth. These changes could be related to the fact that the most significant physiological modifications to adapt to extra-uterine life occur in these organs (beginning of respiration, nutrient absorption and contact with new physical-chemical agents).

Based on the analysis of specific experimental models of intestine and skin, we demonstrated that in intestine, VIC/ET-2, in addition to the contraction-relaxation function, it has been postulated that this system would be implied in the regulation of the sieve/barrier function, mobility processes and mechanic sensibility of intestinal villi. This regulation would target fibroblasts of the subepithelial and lamina propia layers. Moreover, it has been postulated that VIC/ET-2 is secreted from the basal membrane of epithelial cells and acts as a chemoattractant in macrophage recruitment to the lamina, modulating the immune response in the mucosa. Finally, we confirmed that VIC/ET-2 and its receptors are activated by exposition to short ultraviolet radiation (UV-C); secreted from the epidermis, it would act as a paracrine factor in melanocyte growth and melanogenesis, and as an autocrine factor in keratinocyte growth.

From the evaluation of the evidence presented here, we can conclude that the Vasoactive Intestinal Contractor has multiple physiological roles in other systems besides the gastrointestinal tract. These roles are performed via its receptors in autocrine and/or paracrine ways, mainly during embryony development, reproduction and activation of UV-radiation protection mechanisms.

## VII - BIBLIOGRAFIA

- Abassi, Z.A.; Tate, J.E.; Golomb, E. y Keiser, H.R. (1992). Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension*. 20:89-95.
- Abdel-Naser, M.B.; El-Khateeb, E.A.; Sallam, T.H. y Habib, M.A. (2006). Endothelin-1 is significantly elevated in plasma of patients with vitiligo treated with psoralen plus ultraviolet A. *Clin. Exp. Dermatol.* 31:571-5.
- Adams, J.A. (2006). Endothelium and cardiopulmonary resuscitation. *Crit. Care. Med.* 34: S458-S465.
- Adur, J.; Takizawa, S.; Quan, J.; Uchide, T. y Saida, K. (2003). Increased gene expression and production of murine endothelin receptors after birth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:700-706.
- Adur, J.; Uchide, T.; Takizawa, S.; Quan, J. y Saida, K. (2004). Real-time Polymerase Chain Reaction Quantification of Gene Expression Levels of Murine Endothelin-A and Endothelin-B Receptors: Gene Expression Profiles by the Standard Curve Method. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44:S321-S328.
- Adur, J.; Takizawa, S.; Uchide, T.; Casco, V. y Saida, K. (2007). High doses of ultraviolet-C irradiation increases vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 expression in keratinocytes of the newborn mouse epidermis. *Peptides*. 28:1083-1094.
- Ahn, G.Y.; Butt, K.I.; Jindo, T.; Yaguchi, H.; Tsuboi, R. y Ogawa, H. (1998). The expression of endothelin-1 and its binding sites in mouse skin increased after ultraviolet B irradiation or local injection of tumor necrosis factor alpha. *J. Dermatol.* 25:78-84.
- Ambalavanan, N.; Li, P.; Bulger, A.; Murphy-Ullrich, J.; Oparil, S. y Chen, Y.F. (2007). Endothelin-1 mediates hypoxia-induced increases in vascular collagen in the newborn mouse lung. *Pediatr. Res.* 61:559-564.
- Andersen, B.M.; Bånrud, H.; Bøe, E.; Bjordal, O. y Drangsholt, F. (2006). Comparison of UV C light and chemicals for disinfection of surfaces in hospital isolation units. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 27:729-734.
- Andoh, A.; Zhang, Z.; Inatomi, O.; Fujino, S.; Deguchi, Y.; Araki, Y.; Tsujikawa, T.; Kitoh, K.; Kim-Mitsuyama, S.; Takayanagi, A.; Shimizu, N. y Fujiyama, Y. (2005). Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology*. 129:969-984.

- Anguelova, E.; Beuvon, F.; Leonard, N.; Chaverot, N.; Varlet, P.; Couraud, P.O.; Dumas-Duport, C. y Cazaubon, S. (2005). Functional endothelin ET B receptors are selectively expressed in human oligodendrogliomas. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 137:77-88.
- Aoki, H. ; Motohashi, T. ; Yoshimura, N. ; Yamazaki, H. ; Yamane, T. ; Panthier, J.J. y Kunisada, T. (2005). Cooperative and indispensable roles of endothelin 3 and KIT signalings in melanocyte development. *Dev. Dyn.* 233:407-417.
- Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H. y Nakanishi, S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 348:730-732.
- Arai, H.; Nakao, K.; Takaya, K.; Hosoda, K.; Ogawa, Y.; Nakanishi, S. e Imura, H. (1993). The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J. Biol. Chem.* 268:3463-3470.
- Aucamp, P.J. (2007). Questions and answers about the effects of the depletion of the ozone layer on humans and the environment. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6:319-330.
- Auricchio, A.; Casari, G.; Staiano, A. y Ballabio, A. (1996). Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population. *Hum. Mol. Genet.* 5: 351-354.
- Bacon, C.; Morrison, J.; O'Reilly, G.; Cameron, I. y Davenport, A. (1995). ETA and ETB endothelin receptors in human myometrium characterized by the subtype selective ligands BQ123, BQ3020, FR139317 and PD151242. *J. Endocrinol.* 144:127-134.
- Bagnato, A. y Rosano, L. (2007). Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer progression: a crucial role for the endothelin axis. *Cells. Tissues. Organs.* 185:85-94.
- Balakrishnan, S.M.; Wang, H.D.; Gopalakrishnan, V.; Wilson, T.W. y McNeill, J.R. (1996). Effect of an endothelin antagonist on hemodynamic responses to angiotensin II. *Hipertensión.* 28:806-809.
- Baltazares Lipp, M; Rodriguez H.; Ortega, J.; Sotres, A. y Baltazares Lipp, M.E. (2005). Sistema Endotelina. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 18:308-320.
- Battistini, B.; Warner, T.D.; Fournier, A. y Vane, J.R. (1994). Characterization of ETB receptors mediating contractions induced by endothelin-1 or IRL 1620 in guinea-pig isolated airways: effects of BQ-123, FR139317 or PD 145065. *Br. J. Pharmacol.* 111:1009-1016.
- Baynash, A.G.; Hosoda, K.; Giaid, A.; Richardson, J.A.; Emoto, N.; Hammer, R.E. y Yanagisawa, M. (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell.* 79:1277-1285.

- Belloni, A.S.; Rossi, G.P.; Andreis, P.G.; Neri, G.; Albertin, G.; Pessina, A.C. y Nussdorfer, G.G. (1996). Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats. *Hypertension*. 27:1153-1159.
- Berking, C.; Takemoto, R.; Satyamoorthy, K.; Shirakawa, T.; Eskandarpour, M. y Hansson, J. (2004). Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B. *Cancer. Res.* 64:807-811.
- Bernsand, M.; Ericsson, P., Bjorkqvist, M.; Zhao, C.M.; Hakanson, R. y Norlen, P. (2003). Submucosal microinfusion of endothelin and adrenaline mobilizes ECL-cell histamine in rat stomach, and causes mucosal damage: a microdialysis study. *Br. J. Pharmacol.* 140:707-717.
- Bigaud, M. y Pelton, J.T. (1992). Discrimination between ETA- and ETB-receptor-mediated effects of endothelin-1 and [Ala 1, 3, 11, 15] endothelin-1 by BQ-123 in the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* 107:912-918.
- Birchall, N.; Orlow, S.J.; Kupper, T. y Pawelek, J. (1991). Interactions between ultraviolet light and interleukin-1 on MSH binding in both mouse melanoma and human squamous carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175:839-845.
- Bloch, K.D.; Eddy, R.L.; Shows, T.B. y Quertermous, T. (1989). cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. *J. Biol. Chem.* 264:18156-18161.
- Blomstrand, F.; Giaume, C.; Hansson, E. y Rönnbäck, L. (1999). Distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling. *Am. J. Physiol.* 277:C616-C627.
- Bockholt, S.M. y BurrIDGE, K. (1993). Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin. *J. Biol. Chem.* 268:14565-14567.
- Bondurand, N.; Natarajan, D.; Barlow, A.; Thapar, N. y Pachnis, V. (2006). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development*. 133:2075-2086.
- Brenner, M.; Degitz, K.; Besch, R. y Berking, C. (2005). Differential expression of melanoma-associated growth factors in keratinocytes and fibroblasts by ultraviolet A and ultraviolet B radiation. *Br. J. Dermatol.* 153:733-739.
- Buchan, K.W.; Sumner, M.J. y Watts, I.S. (1993). Human placental membranes contain predominantly ET-B receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 Suppl 8:S136- S139.
- Bull, H.A.; Bunker, C.B.; Terengui, G.; Springall, D.R.; Zhao, Y. y Polak, J.M. (1991). Endothelin-1 in human skin: immunolocalization, receptor binding, mRNA expression, and effects on cutaneous microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 97:618-623.
- Burnstock, G. (2001). Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends*.

*Pharmacol. Sci.* 22:182-188.

- Bustin, S.A.; Gyselman, V.G.; Williams, N.S. y Dorudi, S. (1999). Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer.* 79: 1813-1820.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25:169-193.
- Cale, J.M.; Millican, D.S.; Itoh, H.; Magness, R.R. y Bird, I.M. (1997). Pregnancy induces an increase in the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in uterine artery endothelial cells. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 4:284-292.
- Callera, G.; Tostes, R.; Savoia, C.; Muscara, M.N. y Touyz, R.M. (2007). Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 5:531- 552.
- Calvo, E.L.; Boucher, C.; Coulombe, Z. y Morisset, J. (1997). Pancreatic GAPDH gene expression during ontogeny and acute pancreatitis induced by caerulein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:636-640.
- Cassin, S.; Kristova, V.; Davis, T.; Kadowitz, P. y Gause, G. (1991). Tone-dependent responses to endothelin in the isolated perfused fetal sheep pulmonary circulation in situ. *J. Appl. Physiol.* 70:1228-1234.
- Chan, T.S.; Lin, C.X.; Chan, W.Y.; Chung, S.S. y Chung, S.K. (1995). Mouse preproendothelin-1 gene. cDNA cloning, sequence analysis and determination of sites of expression during embryonic development. *Eur. J. Biochem.* 234:819-826.
- Cheng, H.F.; Su, Y.M.; Yeh, J.R. y Chang, K.J. (1993). Alternative transcript of the nonselective-type endothelin receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44:533-538.
- Clouthier, D.E.; Hosoda, K.; Richardson, J.A.; Williams, S.C.; Yanagisawa, H.; Kuwaki, T.; Kumada, M.; Hammer, R.E. y Yanagisawa, M. (1998). Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development.* 125:813-824.
- Clozel, M.; Gray, G.A. ; Breu, V. ; Loffler, B.M. y Osterwalder, R. (1992). The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:867-873.
- Cotrina, M.L.; Lin, J.H. y Nedergaard, M. (1998). Cytoskeletal assembly and ATP release regulate astrocytic calcium signaling. *J. Neurosci.* 18:8794-8804.
- Coulombe, M.; Battistini, B.; Stankova, J.; Pouliot, P. y Bissonnette, E.Y. (2002). Endothelins regulate mediator production of rat tissue-cultured mucosal mast cells. Up-regulation of Th1 and inhibition of Th2 cytokines. *J. Leuko. Biolo.* 71:829-836.

- Cristol, J.P.; Warner, T.D.; Thiemermann, C. y Vane, J.R. (1993). Mediation via different receptors of the vasoconstrictor effects of endothelins and sarafotoxins in the systemic circulation and renal vasculature of the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* 108:776-779.
- De Fabo, E.C.; Noonan, F.P.; Fears, T. y Merlino, G. (2004). Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer. Res.* 64:6372-6376.
- de la Monte, S.M.; Quertermous, T.; Hong, C.C. y Bloch, K.D. (1995). Regional and maturation-associated expression of endothelin 2 in rat gastrointestinal tract. *J. Histochem. Cytochem.* 43:203-209.
- Demunter, A.; De Wolf-Peeters, C.; Degreef, H.; Stas, M. y van den Oord, J.J. (2001). Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows. Arch.* 438:485-491.
- Deng, A.Y. (1997). Structure and organization of the rat endothelin-2 gene. *Mamm. Genome.* 8:157.
- Desaki, J. y Shimizu, M. (2000). A re-examination of the cellular reticulum of fibroblast-like cells in the rat small intestine by scanning electron microscopy. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*.49:203-208.
- Devary, Y.; Gottlieb, R.A.; Smeal, T. y Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell.* 71:1081-1091.
- Domali, E.; Asproдини, E.; Molyvdas, P.A. y Messinis, I.E. (2001). In vitro effects of endothelin-1 on the contractility of myometrium obtained from pre- and postmenopausal women. *J. Endocrinol.* 168:153-162.
- Domali, E.; Molyvdas, P.A. y Messinis, I.E. (2005). In vitro responsiveness of human post-menopausal myometrium to endothelin-1 and ovarian steroids. *J. Endocrinol. Invest.* 28: 485-493.
- Donckier, J.E.; Michel, L.; Delos, M.; Havaux, X. y Van Beneden. R. (2006). Interrelated overexpression of endothelial and inducible nitric oxide synthases, endothelin-1 and angiogenic factors in human papillary thyroid carcinoma. *Clin. Endocrinol.* 64:703-710.
- Ducancel, F.; Matre, V.; Dupont, C.; Lajeunesse, E.; Wollberg, Z.; Bdolah, A.; Kochva, E.; Boulain, J.C. y Menez, A. (1993). Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding precursors of sarafotoxins. Evidence for an unusual "rosary-type" organization. *J. Biol. Chem.* 268:3052-3055.
- Dupuis, J.; Goresky, C.A. y Fournier, A. (1996). Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J. Appl. Physiol.* 81:1510-1515.

- Dupuis, J.; Jasmin, J.F.; Prie, S. y Cernacek, P. (2000). Importance of local production of endothelin-1 and of the ET-B receptor in the regulation of pulmonary vascular tone. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 13:135-140.
- Eberle, J.; Fecker, L.F.; Orfanos, C.E. y Geilen, C.C. (2002). Endothelin-1 decreases basic apoptotic rates in human melanoma cell lines. *J. Invest. Dermatol.* 119:549-555.
- Eddahibi, S.; Springall, D.; Mannan, M.; Carville, C.; Chabrier, P.E.; Levame, M.; Raffestin, B.; Polak, J. y Adnot, S. (1993). Dilator effect of endothelins in pulmonary circulation: changes associated with chronic hypoxia. *Am. J. Physiol.* 265: L571-L580.
- Edwards, D.R. y Denhardt, D.T. (1985). A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 157:127-143.
- Egidy, G.; Juillerat-Jeanneret, L.; Korth, P.; Bosman, F.T. y Pinet, F. (2000a). The endothelin system in normal human colon. *Am. J. Physiol. Gast. Liv. Physiol.* 279:G211-G222.
- Egidy, G.; Juillerat-Jeanneret, L.; Jeannin, J.F.; Korth, P.; Bosman, F.T. y Pinet, F. (2000b) Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *Am. J. Pathol.* 157:1863-1874.
- Ehrenreich, H.; Anderson, R.W.; Fox, C.H.; Rieckmann, P.; Hoffman, G.S.; Travis, W.D.; Coligan, J.E.; Kehrl, J.H. y Fauci, A.S. (1990). Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J. Exp. Med.* 172:1741-1748.
- Ehrenreich, H.; Burd, P.R.; Rottem, M.; Hültner, L.; Hylton, J.B.; Garfield, M.; Coligan, J.E.; Metcalfe, D.D. y Fauci, A.S. (1992). Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. *New. Biol.* 4:147-156.
- Ehrenreich, H. (1999). The astrocytic endothelin system: toward solving a mystery focus on "distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling". *Am. J. Physiol.* 277:C614-C615.
- Elshourbagy, N.A.; Lee, J.A.; Korman, D.R.; Nuthalaganti, P.; Sylvester, D.R.; Dilella, A.G.; Sutiphong, J.A. y Kumar, C.S. (1992). Molecular cloning and characterization of the major endothelin receptor subtype in porcine cerebellum. *Mol. Pharmacol.* 41:465-473.
- Emori, T.; Hirata, Y. y Marumo, F. (1990). Specific receptors for endothelin-3 in cultured bovine endothelial cells and its cellular mechanism of action. *FEBS Lett.* 263:261-264.
- Emori, T.; Hirata, Y.; Ohta, K.; Kanno, K.; Eguchi, S.; Imai, T.; Shichiri, M. y Marumo, F. (1991). Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension.* 18:165-170.

- Ergul, A. (2002). Endothelin-1 and endothelin receptor antagonists as potential cardiovascular therapeutic agents. *Pharmacotherapy*. 221:54-65.
- Escrig, C.; Bishop, A.E.; Inagaki, H.; Moscoso, G.; Takahashi, K.; Varndell, I.M.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R. y Polak, J. M. (1992). Localization of endothelin like immunoreactivity in adult and developing human gut. *Gut*. 33:212-217.
- Fagny, C.; Michel, A.; Nortier, J. y Deschodt-Lanckman, M. (1992). Enzymatic degradation of endothelin-1 by activated human polymorphonuclear neutrophils. *Regul. Pept.* 42:27-37.
- Feldstein, C. y Romero, C. (2007). Role of endothelins in hypertension. *Am. J. Ther.* 14:147-153.
- Firth, J.D y Ratcliffe, P.J. (1992). Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J. Clin. Invest.* 90:1023-1031.
- Fu, T.; Chang, W.; Ishida, N.; Saida, K.; Mitsui, Y.; Okano, Y. y Nozawa, Y. (1989). Effects of vasoactive intestinal contractor (VIC) and endothelin on intracellular calcium level in neuroblastoma NG108-15 cells. *FEBS Lett.* 257:351-353.
- Fu, T.; Okano, Y.; Zhang, W.; Ozeki, T.; Mitsui, Y. y Nozawa, Y. (1990). Receptor-linked early events induced by vasoactive intestinal contractor (VIC) on neuroblastoma and vascular smooth-muscle cells. *Biochem J.* 272:71-77.
- Fujimori, Y.; Uchide, T.; Saida, K.; Temma, K.; Sasaki, T. y Akera, T. (2003). Cloning of full-length preproendothelin-2 cDNA and its expression in dog. *J. Vet. Med. Sci.* 65:1217-1225.
- Fukunaga, M.; Fujiwara, Y.; Ochi, S.; Yokoyama, K.; Fujibayashi, M.; Orita, Y.; Fukuhara, Y.; Ueda, N. y Kamada, T. (1991). Stimulatory effect of thrombin on endothelin-1 production in isolated glomeruli and cultured mesangial cells of rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17:411-413.
- Funasaka, Y.; Chakraborty, A.K.; Hayashi, Y.; Komoto, M.; Ohashi, A. y Nagahama, M. (1998). Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *Br. J. Dermatol.* 139:216-224.
- Furuya, S. y Furuya, K. (1993). Characteristics of cultured subepithelial fibroblasts of rat duodenal villi. *Anat. Embryol. (Berl)*. 187:529-538.
- Furuya, K.; Furuya, S. y Yamagishi, S. (1994). Intracellular calcium responses and shape conversions induced by endothelin in cultured subepithelial fibroblasts of rat duodenal villi. *Pflugers. Arch.* 428:97-104.
- Furuya, S.; Furuya, K.; Sokabe, M.; Hiroe, T. y Ozaki, T. (2005). Characteristics of cultured subepithelial fibroblasts in the rat small intestine. II. Localization and functional analysis of endothelin receptors and cell-shape-independent gap junction permeability. *Cell. Tissue. Res.*

319:103-119.

- Furuya, S. y Furuya, K. (2007). Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: roles in intercellular communication. *Int. Rev. Cytol.* 264:165-223.
- Galie, N.; Manes, A. y Branzi, A. (2004). The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc. Res.* 61:227-237.
- Galron, R.; Bdolah, A.; Kochva, E.; Wollberg, Z.; Kloog, Y. y Sokolovsky, M. (1991). Kinetic and cross-linking studies indicate different receptors for endothelins and sarafotoxins in the ileum and cerebellum. *FEBS Lett.* 283:11-14.
- Garipey, C.E.; Cass, D.T. y Yanagisawa, M. (1996). Null mutation of endothelin receptor type B gene in spotting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 867-872.
- Gerard, C.J.; Olsson, K.; Ramanathan, R.; Reading, C. y Hanania, E.G. (1998). Improved quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using real-time polymerase chain reaction and plasmid-DNA complementarity determining region III standards. *Cancer. Res.* 58:3957-3964.
- Giannasca, P.J.; Giannasca, K.T.; Falk, P.; Gordon, J.I. y Neutra, M.R. (1994). Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines. *Am. J. Physiol.* 267:G1108-G1121.
- Giannessi, D.; del Ry, S. y Vitale, R.L. (2001). The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol. Res.* 43:111-126.
- Giaume, C.; Cordier, J. y Glowinski, J. (1992). Endothelins Inhibit Junctional Permeability in Cultured Mouse Astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 4:877-881.
- Gibson, U.E.M.; Heid, C.A. y Williams, P.M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome. Res.* 6:995-1001.
- Glassberg, M.K.; Ergul, A.; Wanner, A. y Puett, D. (1994). Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10:316-321.
- Gómez, S.I.; Feldstein, C.A. y Romero, J.C. (2004). Endotelinas y su papel en la hipertensión. *Rev. CONAREC.* 77:229-235.
- Gray, G.A.; Löffler, B.M. y Clozel, M. (1994). Characterization of endothelin receptors mediating contraction of rabbit saphenous vein. *Am. J. Physiol.* 266:H959-H966.
- Greep, R.O.; Astwood, E.B. y Geiger, S.R. Eds. (1973). Handbook of Physiological Endocrinology II. Sec 7. Chicago, American Physiological Society. 130-156.
- Grimshaw, M.J.; Naylor, S. y Balkwill, F.R. (2002a). Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol. Cancer. Ther.* 1:1273-1281.

- Grimshaw, M.J.; Wilson, J.L. y Balkwill, F.R. (2002b). Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur. J. Immunol.* 32:2393–2400.
- Grimshaw, M.J.; Hagemann, T.; Ayhan, A.; Gillett, C.E.; Binder, C. y Balkwill, F.R. (2004). A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer. Res.* 64:2461–2468.
- Guimarães, C.L.; Trentin, P.G. y Rae, G.A. (2002). Endothelin ET(B) receptor-mediated mechanisms involved in oleic acid-induced acute lung injury in mice. *Clin. Sci. (Lond).* 48: 340S-344S.
- Habre, W.; Peták, F.; Ruchonnet-Metrailler, I.; Donati, Y.; Tolsa, J.F.; Lele, E.; Albu, G.; Beghetti, M. y Barazzone-Argiroffo, C. (2006). The role of endothelin-1 in hyperoxia-induced lung injury in mice. *Respir. Res.* 7:45.
- Hachiya, A.; Kobayashi, T.; Takema, Y. e Imokawa G. (2002). Biochemical characterization of endothelin-converting enzyme-1alpha in cultured skin-derived cells and its postulated role in the stimulation of melanogenesis in human epidermis. *J. Biol. Chem.* 277:5395-5403.
- Hachiya, A.; Kobayashi, A.; Yoshida, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y. e Imokawa, G. (2004). Biphasic expression of two paracrine-1 melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am. J. Pathol.* 165:2099-2109.
- Hahn, A.W.; Resink, T.J.; Scott-Burden, T.; Powell, J.; Dohi, Y. y Buhler, F.R. (1990). Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell. Regul.* 1:649-659.
- Hara, M.; Yaar, M. y Gilchrest, B.A. (1995). Endothelin-1 of keratinocyte origin is a mediator of melanocyte dendricity. *J. Invest. Dermatol.* 105:744-748.
- Hashimoto, Y. y Komuro, T. (1988). Close relationships between the cells of the immune system and the epithelial cells in the rat small intestine. *Cell. Tissue. Res.* 254:41-47.
- Hay, D.W.; Luttmann, M.A.; Hubbard, W.C. y Udem, B.J. (1993). Endothelin receptor subtypes in human and guinea-pig pulmonary tissues. *Br. J. Pharmacol.* 110:1175-1183.
- Haynes, W.G.; Ferro, C.E. y Webb, D.J. (1995). Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26:183-185.
- Heid, C.A.; Stevens, J.; Livak, K.J. y Williams, P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome. Res.* 6:986–994.
- Heluy, V.; Germain, G.; Fournier, T.; Ferre, F. y Breuiller-Fouche, M. (1995). Endothelin ETA receptors mediate human uterine smooth muscle contraction. *Eur. J. Pharmacol.* 285:89-94.
- Henry, P.J. (1993). Endothelin-1 (ET-1)-induced contraction in rat isolated trachea: involvement of ETA and ETB receptors and multiple signal transduction systems. *Br. J. Pharmacol.*

110:435-441.

- Hickey, K.A.; Rubanyi, G.; Paul, R.J. y Highsmith, R.F. (1985). Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 248:550-556.
- Highsmith, R.F. (1998). Endothelin. Molecular Biology, Physiology, and Pathology. (Highsmith). Humana Press. New Jersey. pp 1-274.
- Higuchi, R.; Fokler, C.; Dollinger, G. y Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio-Technology.* 11:1026-1030.
- Hirobe, T. (1984). Histochemical survey of the distribution of the epidermal melanoblasts and melanocytes in the mouse during fetal and postnatal periods. *Anat. Rec.* 208:589-594.
- Hirobe, T. (2001). Endothelins are involved in regulating the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanocytes in serum-free primary culture. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 6:25-31.
- Hislop, A.A.; Zhao, Y.D.; Springall, D.R.; Polak, J.M. y Haworth, S.G. (1995). Postnatal changes in endothelin-1 binding in porcine pulmonary vessels and airways. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 12:557-566.
- Hogaboam, C.M.; Muller, M.J.; Collins, S.M. y Hunt, R.H. (1996). An orally active non-selective endothelin receptor antagonist bosentan, markedly reduced injury in a rat model of colitis. *Euro. J. Pharmacol.* 309:261-269.
- Holland, P.M.; Abramson, R.D.; Watson, R. y Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. of Scin. USA.* 88:7276-7278.
- Hosoda, K.; Nakao, K.; Hiroshi-Arai Suga, S.; Ogawa, Y.; Mukoyama, M.; Shirakami, G.; Saito, Y.; Nakanishi, S. e Imura, H. (1991). Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett.* 287:23-26.
- Hosoda, K.; Nakao, K.; Tamura, N.; Arai, H.; Ogawa, Y.; Suga, S.; Nakanishi, S. e Imura, H. (1992). Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J. Biol. Chem.* 267:18797-18804.
- Hosoda, K.; Hammer, R.E.; Richardson, J.A.; Baynash, A.G.; Cheung, J.C.; Giaid, A. y Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell.* 79:1267-1276.
- Huet-Hudson, Y.; Chakraborty, C.; De, S.; Suzuki, Y.; Andrews, G. y Dey, S. (1990). Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol. Endocrinol.* 4:510-523.

- Huggins, J.P.; Pelton, J.T. y Miller, R.C. (1993). The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine. *Pharmacol. Ther.* 59:55-123.
- Hunyady, B.; Mezey, E. y Palkovits, M. (2000). Gastrointestinal immunology: cell types in the lamina propria--a morphological review. *Acta. Physiol. Hung.* 87:305-328.
- Imokawa, H.; Miyagishi, M. e Yada, Y. (1995). Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 105:32-37.
- Imokawa, G.; Kobayashi, T.; Miyagishi, M.; Higashi, K. e Yada, Y. (1997). The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment. Cell. Res.* 10:218-228.
- Inagaki, H.; Bishop, A.E.; Escrig, C.; Wharton, J.; Allen-Mersh, T.G. y Polak, J. M. (1991). Localization of endothelin like immunoreactivity and endothelin binding sites in human colon. *Gastroenterology* 101:47-54.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kayusa, Y., Miyauchi, T., Goto, M. y Masaki, T. (1989a). The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct iso-peptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2863-28677.
- Ishida, N.; Tsujioka, K.; Tomoi, M.; Saida, K. y Mitsui, Y. (1989). Differential activities of two distinct endothelin family peptides on ileum and coronary artery. *FEBS Lett.* 247:337-340.
- Ishikawa, T.; Yanagisawa, M.; Kimura, S.; Goto, K. y Masaki, T. (1988). Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am. J. Physiol.* 255: 970-973.
- Ito, H.; Hirata, Y.; Adachi, S.; Tanaka, M.; Tsujino, M.; Koike, A.; Nogami, A.; Murumo, F. y Hiroe, M. (1993). Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 92:398-403.
- Ivy, D.; McMurtry, I.F.; Yanagisawa, M.; Gariepy, C.E.; Le Cras, T.D.; Gebb, S.A.; Morris, K.G.; Wiseman, R.C. y Abman, S.H. (2001). Endothelin B receptor deficiency potentiates ET-1 and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 280: L1040-L1048.
- Jaken, S.; Leach, K. y Klauck, T. (1989). Association of type 3 protein kinase C with focal contacts in rat embryo fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 109:697-704.
- Jobson, T.M.; Billington, C.K. y Hall, I.P. (1998). Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation. *J. Clin. Invest.* 101:2650-2657.
- Joyce, N.C.; Haire, M.F. y Palade, G.E. (1987). Morphologic and biochemical evidence for a

contractile cell network within the rat intestinal mucosa. *Gastroenterology*. 92:68-81.

- Jozsef, L.; Khreiss, T.; Fournier, A.; Chan, J.S. y Filep, J.G. (2002). Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br. J. Pharmacol.* 135:1167-1174.

- Kadekaro, A.L.; Kavanagh, R.; Kanto, H.; Terzieva, S.; Hauser, J. y Kobayashi, N. (2005). Alpha-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer. Res.* 65:4292-4299.

- Karne, S.; Jayawickreme, C.K. y Lerner, M.R. (1993). Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.* 268:19126-19133.

- Katona, E.; Juhasz, M.; Varga, Z.; Paragh, G.; Fulesdi, B. y Pall, D. (2006). The role and clinical importance of nitric oxide-endothelin system in hypertension. *Orv. Hetil.* 147: 1819-1824.

- Kawanabe, Y.; Hashimoto, N. y Masaki, T. (2002). Characterization of G proteins involved in activation of nonselective cation channels by endothelin(B) receptor. *Br. J. Pharmacol.* 136:1015-1022.

- Kernochan, L.E.; Tran, B.N.; Tangkijvanich, P.; Melton, A.C.; Tam, S.P. y Yee, H.F. Jr. (2002). Endothelin-1 stimulates human colonic myofibroblast contraction and migration. *Gut.* 50:65-70.

- Kikuchi, K.; Nakagawa, H.; Kadono, T.; Etoh, T.; Byers, H.R.; Mihm, M.C. y Tamaki, K. (1996). Decreased ET(B) receptor expression in human metastatic melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219:734-739.

- Kim, K.K. y Chapman, H.A. (2007). Endothelin-1 as initiator of epithelial-mesenchymal transition: potential new role for endothelin-1 during pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 37:1-2.

- Kim, H.J.; Choi, C.P.; Uhm, Y.K.; Kim, Y.I.; Lee, J.W.; Yoon, S.H.; Chung, J.H. y Lee, M.H. (2007). The association between endothelin-1 gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo in a Korean population. *Exp. Dermatol.* 16:561-566.

- Kloog, Y.; Ambar, I.; Sokolovsky, M.; Kochva, E.; Wollberg, Z. y Bdolah, A. (1988). Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science.* 242:268-270.

- Knock, G.A.; Terenghi, G.; Bunker, C.B.; Bull, H.A.; Dowd, P.M. y Polak, J.M. (1993). Characterization of endothelin-binding sites in human skin and their regulation in primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J. Invest Dermatol.* 101:73-78.

- Ko, C.; Gieske, M.C.; Al-Alem, L.; Hahn, Y.; Su, W.; Gong, M.C.; Iglarz, M. y Koo, Y. (2006). Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology*. 147:1770-1779.
- Komuro, T. (1985). Fenestrations of the basal lamina of intestinal villi of the rat. Scanning and transmission electron microscopy. *Cell. Tissue. Res.* 239:183-188.
- Komuro, T. y Hashimoto, Y. (1990). Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa). *Arch. Histol. Cytol.* 53:1-21.
- Kondo, S. y Jimbow, K. (1998). Dose-dependent induction of IL-12 but not IL-10 from human keratinocytes after exposure to ultraviolet light A. *J. Cell. Physiol.* 177:493-498.
- Kondo, S. (1999). The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 4:177-183.
- Kossodo, S.; Wong, W.R.; Simon, G. y Kochevar, I.E. (2004). Effects of UVR and UVR-induced cytokines on production of extracellular matrix proteins and proteases by dermal fibroblasts cultured in collagen gels. *Photochem. Photobiol.* 79:86-93.
- Kotake-Nara, E.; Takizawa, S.; Quan, J.; Wang, H. y Saida, K. (2005). Cobalt chloride induces neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC-12 cells through regulation of ET-2/VIC. *J. Neurosci. Res.* 81:563-571.
- Kotake-Nara, E.; Takizawa, S. y Saida K. (2007). Endothelin-2/vasoactive intestinal contractor via ROCK regulates transglutaminase 1 on differentiation of mouse keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357:168-173.
- Kovács, G.; Fekete, A.; Bérces, A. y Rontó, G. (2007). The effect of the short wavelength ultraviolet radiation. An extension of biological dosimetry to the UV-C range. *J. Photochem. Photobiol. B.* 88:77-82.
- Kozakai, T.; Zhao, H.; Sakate, M.; Masuo, Y.; Uchide, T. y Saida, K. (2002). Effect of aging on gene expression rates of endothelin-1 and endothelin-2/vasoactive intestinal contractor in ethanol-induced gastric mucosal injury of the mouse. *Clin. Sci. (Lond)*. 48:455S-458S.
- Kubota, T.; Kamada, S. y Aso, T. (1994). Endothelin-1 as a local ovarian regulator in porcine granulosa cells. *Horm. Res.* 41:29-35.
- Kurama, M.; Ishida, N.; Matsui, M.; Saida, K. y Mitsui, Y. (1996). Sequence and neuronal expression of mouse endothelin-1 cDNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1307:249-253.
- Kurihara, Y.; Kurihara, H.; Oda, H.; Maemura, K.; Nagai, R.; Ishikawa, T. e Yazaki, Y. (1995). Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J. Clin. Invest.* 96:293-300.

- Kusafuka, T.; Wang, Y. y Puri, P. (1997). Mutation analysis of the RET, the endothelin-B receptor, and the endothelin-3 genes in sporadic cases of Hirschsprung's disease. *J. Pediatr. Surg.* 32: 501-504.
- Lahav, R.; Suva, M.L.; Rimoldi, D.; Patterson, P.H. y Stamenkovic, I. (2004). Endothelin receptor B inhibition triggers apoptosis and enhances angiogenesis in melanomas. *Cancer. Res.* 15:8945-8953.
- Lamb, N.J.; Fernandez, A.; Conti, M.A.; Adelstein, R., Glass, D.B.; Welch, W.J. y Feramisco, J.R. (1988). Regulation of actin microfilament integrity in living nonmuscle cells by the cAMP-dependent protein kinase and the myosin light chain kinase. *J. Cell. Biol.* 106:1955-1971.
- Lauber, K.; Bohn, E.; Kreber, S.M.; Xiao, Y.; Blumenthal, S.G.; Lindemann, R.K.; Marini, P.; Wiedig, C.; Zobywalski, A. y Baksh, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of alpidat traction signal. *Cell.* 113:717-730.
- Lerman, A.; Edwards, B.S.; Hallett, J.W.; Heublein, D.M.; Sandberg, S.M. y Burnett, J.C. Jr. (1991). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 325:997-1001.
- Levin, E.R.; Isackson, P.J. y Hu, R.M. (1991). Endothelin increases atrial natriuretic peptide production in cultured rat diencephalic neurons. *Endocrinology.* 128:2925-2930.
- Levin, E.R. (1995). Endothelins. *N. Engl. J. Med.* 333:356-363.
- Levy, M.; Maurey, C.; Chailley-Heu, B.; Martinovic, J.; Jaubert, F. e Israel-Biet, D. (2005). Developmental changes in endothelial vasoactive and angiogenic growth factors in the human perinatal lung. *Pediatr. Res.* 57:248-253.
- Lillie, E.O.; Mahata, M.; Khandrika, S.; Rao, F.; Bundey, R.A.; Wen, G.; Chen, Y.; Taupenot, L.; Smith, D.W.; Mahata, S.K.; Ziegler, M.G.; Cockburn, M.; Schork, N.J. y O'Connor, D.T. (2007). Heredity of endothelin secretion: human twin studies reveal the influence of polymorphism at the chromogranin A locus, a novel determinant of endothelial function. *Circulation.* 115:2282-2291.
- Lin, W.W. y Lee, C.Y. (1992). Intestinal relaxation by endothelin isopeptides: involvement of Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels. *Eur. J. Pharmacol.* 4:355-360.
- Liu, Y.; Yamada, H. y Ochi, J. (1998). Immunocytochemical studies on endothelin in mast cells and macrophages in the rat gastrointestinal tract. *Histochem. Cell. Biol.* 109:301-307.
- Livak, K.J. (1997). Relative quantification of gene expression , PE-ABI Sequence Detector User Bulletin 2
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 25:402-408.

- Luscher, T.F. y Barton, M. (2000). Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. 102:2434-2440.
- MacCumber, M.W.; Ross, C.A.; Glaser, B.M. y Snyder, S.H. (1989). Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 86:7285-7289.
- MacCumber, M.W.; Ross, C.A. y Snyder, S.H. (1990). Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 87:2359-2363.
- Magini, A.; Granchi, S.; Orlando, C.; Vannelli, G.B.; Pellegrini, S.; Milani, S.; Grappone, C.; De Franco, R.; Susini, T.; Forti, G. y Maggi, M. (1996). Expression of endothelin-1 gene and protein in human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 81:1428-1433.
- Maggi, M.; Vannelli, G.B.; Peri, A.; Brandi, M.L.; Fantoni, G.; Giannini, S.; Torrisi, C.; Guardabasso, V.; Barni, T. y Toscano, V. (1991). Immunolocalization, binding, and biological activity of endothelin in rabbit uterus: effect of ovarian steroids. *Am. J. Physiol*. 260: E292-E305.
- Mähler, M.; Bristol, I.J.; Leiter, E.H.; Workman, A.E.; Birkenmeier, E.H.; Elson, C.O. y Sundberg, J.P. (1998). Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am. J. Physiol*. 274:G544-G551.
- Malek, A. e Izumo, S. (1992). Physiological fluid shear stress causes down regulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am. J. Physiol*. 263:389-396.
- Mamata, D.; Sanford, T.R. y Wood, G.W. (1992). Interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  are produced in the mouse uterus during the estrus cycle and are induced by estrogen and progesterone. *Dev. Biol*. 151:297-305.
- Manaka, L.; Kadono, S.; Kawashima, M.; Kobayashi, T. y Imokawa, G. (2001). The mechanism of hyperpigmentation in seborrhoeic keratosis involves the high expression of endothelin-converting enzyme-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ , which stimulate secretion of endothelin 1. *Br. J. Dermatol*. 145:895-903.
- Mangahas, C. R.; dela Cruz, G. V.; Friedman-Jimenez, G. y Jamal, S. (2005). Endothelin-1 induces CXCL1 and CXCL8 secretion in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol*. 125:307-311.
- Mansur, N.R.; Meyer-Siegler, K.; Wurzer, J.C. y Sirover, M.A. (1993). Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells. *Nucleic. Acids. Res*. 21:993-998.
- Masaki T. (2004). Historical review: Endothelin. *Trends. Pharmacol. Sci*. 25:219-224.

- Massai, L.; Carbotti, P.; Cambiaggi, C.; Mencarelli, M.; Migliaccio, P.; Muscettola, M. y Grasso, G. (2003). Prepro-endothelin-1 mRNA and its mature peptide in human appendix. *Am. J. Physiol. Gast. Liv. Physiol.* 284:G340-G348.
- Masuo, Y.; Ishikawa, Y.; Kozakai, T.; Uchide, T.; Komatsu, Y. y Saida, K. (2003). Vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 gene expression in the murine central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300:661–668.
- Matsumoto, H.; Suzuki, N.; Onda, H. y Fujino, M. (1989). Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:74-80.
- McCartney, S.A.; Ballinger, A.B.; Vojnovic, I.; Farthing, M.J.G. y Warner, T.D. (2002). Endothelin in human inflammatory bowel disease: comparison to rat trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Life Sci.* 71:1893–1904.
- McCormack, J.T. y Greenwald, G.S. (1974). Progesterone and oestradiol-17b concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *J. Endocrinol.* 62:101-107.
- McKaig, B.C.; Makh, S.S.; Hawkey, C.J.; Podolsky, D.K. y Mahida, Y.R. (1999). Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF-beta3. *Am. J. Physiol.* 276:G1087-G1093.
- Merindo Laborda, M.T. (2005). Valor del estudio citométrico del contenido en AND y fase S en los polipos colonicos con cancer focal. Papel de la apoptosis en la secuencia adenoma-cancer de colon. Tesis doctoral. Universidad de Lleida. España. 1-153.
- Mifflin, R.C.; Saada, J.I.; Di Mari, J.F.; Adegboyega, P.A.; Valentich, J.D. y Powell, D.W. (2002). Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282:C824-C834.
- Miller, V.M.; Komori, K.; Burnett, J.C. Jr. y Vanhoutte, P.M. (1989). Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am. J. Physiol.* 257:1127-1131.
- Mizuno, T.; Saito, Y.; Itakura, M.; Ito, F.; Ito, T.; Moriyama, E.N.; Hagiwara, H. e Hirose, S. (1992). Structure of the bovine ETB endothelin receptor gene. *Biochem. J.* 287:305-309.
- Moore, R.; Carlson, S. y Madara, J.L. (1989). Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. *Am. J. Physiol.* 257:G274-G283.
- Morawietz, H.; Szibor, M.; Goettsch, W.; Bartling, B.; Barton, M.; Shaw, S.; Koerfer, R.; Zerkowski, H.R. y Holtz, J. (2000a). Deloading of the left ventricle by ventricular assist device normalizes increased expression of endothelin ET(A) receptors but not endothelin-converting enzyme-1 in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 102:188-193.

- Morawietz, H.; Talanow, R.; Szibor, M.; Rueckschloss, U.; Schubert, A.; Bartling, B.; Darmer, D. y Holtz, J. (2000b). Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J. Physiol.* 525:761-770.
- Moreland, S.; McMullen, D.; Abboa-Offei, B. y Seymour, A. (1994). Evidence for a differential location of vasoconstrictor endothelin receptors in the vasculature. *Br. J. Pharmacol.* 112: 704-708.
- Morgazo, C.; Perfume, G.; Legaz, G.; di Nunzio, A.; Hope, S.I.; Bianciotti, L.G. y Vatta, M.S. (2005). Involvement of nitric oxide pathways in short term modulation of tyrosine hydroxylase activity by endothelins 1 and 3 in the rat anterior hypothalamus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334:796-802.
- Moss, S.F.; Calam, J.; Agarwal, B.; Wang, S. y Holt, P.R. (1996). Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut.* 38:498-501.
- Mou, K.H.; Zhang, X.Q.; Yu, B.; Zhang, Z.L. y Feng, J. (2004). Effects of endothelin-1 on melanocyte adhesion and migration. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 29:247-51.
- Murakami, T.; Fujimoto, M.; Ohtsuki, M. y Nakagawa, H. (2001). Expresión profiling of cancer-related genes in human keratinocytes following non-lethal ultraviolet B irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 27:121-129.
- Muramatsu, M.; Oka, M.; Morio, Y.; Soma, S.; Takahashi, H. y Fukuchi, Y. (1999). Chronic hypoxia augments endothelin-B receptor-mediated vasodilation in isolated perfused rat lungs. *Am. J. Physiol.* 276:L358-L364.
- Murch, S.H.; Braegger, C.P.; Sessa, W.C. y MacDonald, T.T. (1992). High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet.* 339:381-385.
- Nagy, N. y Goldstein, A.M. (2006). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev. Biol.* 293:203-217.
- Naidoo, V.; Naidoo, S.; Mahabeer, R. y Raidoo, D.M. (2004). Cellular distribution of the endothelin system in the human brain. *J. Chem. Neuroanat.* 27:87-98.
- Nair, S.; Li, W.; Cornell, R. y Schilling, T.F. (2007). Requirements for Endothelin type-A receptors and Endothelin-1 signaling in the facial ectoderm for the patterning of skeletogenic neural crest cells in zebrafish. *Development.* 134:335-345.
- Nakagomi, S.; Kiryu-Seo, S. y Kiyama, H. (2000). Endothelin-converting enzymes and endothelin receptor B messenger RNAs are expressed in different neural cell species and these messenger RNAs are coordinately induced in neurons and astrocytes respectively following nerve injury. *Neuroscience.* 101:441-449.

- Nelson, K.; Takahashi, T.; Lee, D.; Luetkeke, N.; Bossert, N.; Ross, K. y Eitzman, B. (1992). Transforming growth factor alpha is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology*. 131:1657-1664.
- Nelson, J.B.; Udan, M.S.; Guruli, G. y Pflug, B.R. (2005). Endothelin-1 Inhibits Apoptosis in Prostate Cancer. *Neoplasia*. 7:631-637.
- Neuhaus, S.J. y Byers, M.R. (2007). Endothelin receptors and endothelin-1 in developing rat teeth. *Arch. Oral. Biol.* 52:655-662.
- Nishigori, C.; Yarosh, D.B.; Ullrich, S.E.; Vink, A.A.; Bucana, C.D.; Roza, L. y Kripke, M.L. (1996). Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 93:10354-10359.
- Noguchi, K.; Noguchi, Y.; Hirose, H.; Nishikibe, M.; Ihara, M.; Ishikawa, K. e Yano, M. (1993). Role of endothelin ETB receptors in bronchoconstrictor and vasoconstrictor responses in guinea-pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 233:47-51.
- Nunez, D.J.; Brown, M.J.; Davenport, A.P.; Neylon, C.B.; Schofield, J.P. y Wyse, R.K. (1990). Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissues. *J. Clin. Invest.* 85:1537-1541.
- Ogawa, Y.; Nakao, K.; Arai, H.; Nakagawa, O.; Hosoda, K.; Suga, S.; Nakanishi, S. e Imura, H. (1991). Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178:248-255.
- Ohkubo, S.; Ogi, K.; Hosoya, M.; Matsumoto, H.; Suzuki, N.; Kimura, C.; Ondo, H. y Fujino, M. (1990). Specific expression of human endothelin-2 (ET-2) gene in a renal adenocarcinoma cell line. Molecular cloning of cDNA encoding the precursor of ET-2 and its characterization. *FEBS Lett.* 12:136-140.
- Okayasu, I.; Hatakeyama, S.; Yamada, M.; Ohkusa, T.; Inagaki, Y. y Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 98:694-702.
- Oliveira, J.G.; Prados, R.Z.; Guedes, A.C.; Ferreira, P.C. y Kroon, E.G. (1999). The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is inappropriate as internal control in comparative studies between skin tissue and cultured skin fibroblasts using Northern blot analysis. *Arch. Dermatol. Res.* 291:659-661.
- Osada, K.; Tsunoda, H.; Miyauchi, T.; Sugishita, Y.; Kubo, T. y Goto, T. (1997). Pregnancy increases ET-1 induced contraction and changes receptor subtypes in uterine smooth muscle in humans. *Am. J. Physiol.* 272:541-548.
- Palanisamy, G.S.; Cheon, Y.P. ; Kim, J.; Kannan, A.; Li, Q.; Sato, M.; Mantena, S.R.;

- Sitruk-Ware, R.L.; Bagchi, M.K. y Bagchi, I.C. (2006). A novel pathway involving progesterone receptor, endothelin-2, and endothelin receptor B controls ovulation in mice. *Mol. Endocrinol.* 20:2784-2795.
- Parrish, J.A. (1993). In: Goldsmith LA, ed. Biochemistry and physiology of the skin, vol II. New York. Oxford University Press. Pp 713-733.
  - Patil, J.S.; Kimoto, H.; Kimoto, T. y Saino, T. (2007). Ultraviolet radiation (UV-C): a potential tool for the control of biofouling on marine optical instruments. *Biofouling.* 23:215-230.
  - Perez del Villar, C.; Garcia Alonso, C.J.; Feldstein, C.A.; Juncos, L.A. y Romero, J.C. (2005). Role of endothelin in the pathogenesis of hypertension. *Mayo. Clin. Proc.* 80:84-96.
  - Pernet, I.; Mayoux, C.; Trompezinski, S.; Schmitt, D. y Viac, J. (2000). Modulation of endothelin-1 in normal human keratinocytes by UVA/B radiations, prostaglandin E2 and peptidase inhibitors. *Exp. Dermatol.* 9:401-406.
  - Petit-Frère, C.; Clingen, P.H.; Grewe, M.; Krutmann, J.; Roza, L.; Arlett, C.F. y Green, M.H. (1998). Induction of interleukin-6 production by ultraviolet radiation in normal human epidermal keratinocytes and in a human keratinocyte cell line is mediated by DNA damage. *J. Invest. Dermatol.* 111:354-359.
  - Phillipson, R.P.; Tobi, S.E.; Morris, J.A. y McMillan, T.J. (2002). UV-A induces persistent genomic instability in human keratinocytes through an oxidative stress mechanism. *Free. Rad. Biol. Med.* 32:474-480.
  - Pla, P. y Larue, L. (2003). Involvement of endothelin receptors in normal and pathological development of neural crest cells. *Int. J. Dev. Biol.* 47:315-325.
  - Poiiock, D.M. (1998). Endothelin: Molecular Biology, Physiology, and Pathology. Endothelin receptor subtypes and tissue distribution. (R.T. Highsmith). Human Press, New Jersey, pp 1-29.
  - Pollock, D.M. y Opgenorth, T.J. (1993). Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ET-A receptor activation. *Am. J. Physiol.* 264(1 Pt 2): R222-R226.
  - Pollock, D.M. y Opgenorth, T.J. (1994). ETA receptor-mediated responses to endothelin-1 and big endothelin-1 in the rat kidney. *Br. J. Pharmacol.* 111:729-732.
  - Powell, D.W.; Mifflin, R.C.; Valentich, J.D.; Crowe, S.E.; Saada, J.I. y West, A.B. (1999a). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol.* 277:C1-C9.
  - Powell, D.W.; Mifflin, R.C.; Valentich, J.D.; Crowe, S.E.; Saada, J.I. y West, A.B. (1999b). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am. J. Physiol.* 277:C183-C201.
  - Powell, D.W.; Adegboyega, P.A.; Di Mari, J.F. y Mifflin, R.C. (2005). Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am. J. Physiol.*

*Gastrointest. Liver. Physiol.* 289:G2-G7.

- Puissant, C.; Bayat-Sarmadi, M.; Devinoy, E. y Houdebine, L.M. (1994). Variation of transferrin mRNA concentration in the rabbit mammary gland during the pregnancy-lactation-weaning cycle and in cultured mammary cells. A comparison with the other major milk protein mRNAs. *Eur. J. Endocrinol.* 130:522-529.
- Quehenberger, P.; Exner, M.; Sunder-Plassmann, R.; Ruzicka, K.; Bieglmayer, C.; Endler, G.; Muellner, C.; Speiser, W. y Wagner, O. (2002). Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ. Res.* 90:711-718.
- Rachmilewitz, D.; Eliakim, R.; Ackerman, Z. y Karmeli, F. (1992). Colonic endothelin-1 immunoreactivity in active ulcerative colitis. *Lancet.* 339:1062.
- Radler-Pohl, A.; Sachsenmaier, C.; Gebel, S.; Auer, H.P.; Bruder, J.T.; Rapp, U.; Angel, P.; Rahmsdorf, H.J. y Herrlich, P. (1993). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO. J.* 12:1005-1012.
- Randall, M.D.; Douglas, S. y Hiley, C.R. (1989). Vascular activities of endothelin-1 and some alanyl substituted analogues in resistance beds of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 98:685-699.
- Reid, K.; Turnley, A.M.; Maxwell, G.D.; Kurihara, Y.; Kurihara, H.; Bartlett, P.F. y Murphy, M. (1996). Multiple roles for endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development.* 122:3911-3919.
- Remuzzi, G. y Benigni, A. (1993). Endothelins in the control of cardiovascular and renal function. *Lancet.* 342:589-593.
- Ridley, A.J. y Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70:389-399.
- Ridley, A.J.; Paterson, H.F.; Johnston, C.L.; Diekmann, D. y Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70:401-410.
- Ridley, A.J. y Hall, A. (1994). Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *EMBO J.* 13:2600-2610.
- Riley, S.C.; Butt, A.R.; Doughton, B.W.; Li, S.X.; Zheng, S.H.; Findlay, J.K. y Salamonsen, L.A. (1994). Endothelin in the ovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 100:451-459.
- Rodriguez, M.R.; Sabbatini, M.E.; Santella, G.; Dabas, P.; Villagra, A.; Vatta, M.S. y Bianciotti L.G. (2005). Endothelin-3 applied to the brain evokes opposite effects on bile secretion mediated by a central nitric oxide pathway. *Peptides.* 26:1219-1227.
- Rogler, G.; Gelbmann, C.M.; Vogl, D.; Brunner, M.; Schölmerich, J.; Falk, W.; Andus, T. y Brand, K. Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic

- fibroblast/myofibroblast cultures. (2001). *Scand. J. Gastroenterol.* 36:389-398.
- Rozengurt, N.; Springall, D.R. y Polak, J.M. (1990). Localization of endothelin-like immunoreactivity in airway epithelium of rats and mice. *J. Pathol.* 160:5-8.
  - Rubanyi, G.M. y Polokoff, M.A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 46:325-415.
  - Saada, J.I.; Barrera, C.A.; Reyes, V.E.; Adegboyega, P.A.; Suarez, G.; Tamerisa, R.A.; Pang, K.F.; Bland, D.A.; Mifflin, R.C.; Di Mari, J.F. y Powell, D.W. (2004). Intestinal myofibroblasts and immune tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029:379-381.
  - Saada, J.I.; Pinchuk, I.V.; Barrera, C.A., Adegboyega, P.A.; Suarez, G.; Mifflin, R.C.; Di Mari, J.F.; Reyes, V.E. y Powell, D.W. (2006). Subepithelial myofibroblasts are novel nonprofessional APCs in the human colonic mucosa. *J. Immunol.* 177:5968-5979.
  - Sachsenmaier, C.; Radler-Pohl, A.; Zinck, R.; Nordheim, A.; Herrlich, P. y Rahmsdorf, H.F. (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell.* 78: 963-972.
  - Saida, K.; Mitsui, Y. e Ishida, N. (1989). A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity. *J. Biol. Chem.* 264:14613-14616.
  - Saida, K. y Mitsui, Y. (1991). cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of a precursor for vasoactive intestinal contractor (VIC). *Biochim. Biophys. Acta.* 1089:404-406.
  - Saida, K.; Hashimoto, M.; Mitsui, Y.; Ishida, N. y Uchide, T. (2000). The prepro vasoactive intestinal contractor (VIC)/endothelin-2 gene (EDN2): structure, evolution, production, and embryonic expression. *Genomics.* 64:51-61.
  - Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
  - Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Takuwa, Y.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K. y Masaki, T. (1990). Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature.* 348:732-735.
  - Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Inoue, A.; Ryan, U.S.; Kimura, S.; Mitsui, Y.; Goto, K. y Masaki, T. (1991). cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat preproendothelin-1 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175:44-47.
  - Sanz, M.L. (2001). Inmunidad y prevención de la alergia a alimentos. *Alergol. Inmunol. Clin.* 16:58-75.
  - Savoia, C. y Schiffrin, E.L. (2004). Significance of recently identified peptides in hypertension: endothelin, natriuretic peptides, adrenomedullin, leptin. *Med. Clin. North. Am.* 88:39-62.

- Schaller, M.D. y Parsons, J.T. (1993). Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends. Cell. Biol.* 3:258-262.
- Schindler, M.B.; Hislop, A.A. y Haworth, S.G. (2006). Porcine pulmonary artery and bronchial responses to endothelin-1 and norepinephrine on recovery from hypoxic pulmonary hypertension. *Pediatr. Res.* 60:71-76.
- Schmidt, M.; Goebeler, M.; Posern, G.; Feller, S.M.; Seitz, C.S.; Brocker, E.B.; Rapp, U.R. y Ludwig, S. (2000). Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 275:41011-41017.
- Schmittgen, T.D. y Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 46:69-81.
- Seccia, T.M.; Belloni, A.S.; Kreutz, R.; Paul, M.; Nussdorfer, G.G.; Pessina, A.C. y Rossi, G.P. (2003). Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41:666-673.
- Sessa, W.C.; Kaw, S.; Hecker, M. y Vane, J.R. (1991). The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174:613-618.
- Shao, J.; Sheng, G.G.; Mifflin, R.C.; Powell, D.W. y Sheng, H. (2006). Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. *Cancer. Res.* 66:846-855.
- Shapiro, M.B. y Senapathy, P. (1987). RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic. Acids. Res.* 15:7155-7174.
- Shiba, R.; Sakurai, T.; Yamada, G.; Morimoto, H.; Saito, A.; Masaki, T. y Goto, K. (1992). Cloning and expression of rat preproendothelin-3 cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:588-594.
- Shichiri, M.; Kato, H.; Marumo, F. y Hirata, Y. (1997). Endothelin-1 as an Autocrine/Paracrine Apoptosis Survival Factor for Endothelial Cells. *Hypertension.* 30:1198-1203.
- Shichiri, M.; Sedivy, J.M.; Marumo, F. y Hirata, Y. (1998). Endothelin-1 is a potent survival factor for c-Myc-dependent apoptosis. *Mol. Endocrinol.* 12:172-80.
- Shigematsu, T.; Miura, S.; Hirokawa, M.; Hokari, R.; Higuchi, H.; Watanabe, N.; Tsuzuki, Y.; Kimura, H.; Tada, S.; Nakatsumi, R.C.; Saito, H. e Ishii, H. (1998). Induction of endothelin-1 synthesis by IL-2 and its modulation of rat intestinal epithelial cell growth. *Am. J. Physiol.* 275:G556-G663.
- Shi-Wen, X.; Rodriguez-Pascual, F.; Lamas, S.; Holmes, A.; Howat, S.; Pearson, J.D.;

- Dashwood, M.R.; du Bois, R.M.; Denton, C.P.; Black, C.M.; Abraham, D.J. y Leask, A. (2006). Constitutive ALK5-independent c-Jun N-terminal kinase activation contributes to endothelin-1 overexpression in pulmonary fibrosis: evidence of an autocrine endothelin loop operating through the endothelin A and B receptors. *Mol. Cell. Biol.* 26:5518-5527.
- Shyamala, V.; Moulthrop, T.H.; Stratton-Thomas, J. y Tekamp-Olson, P. (1994). Two distinct human endothelin B receptors generated by alternative splicing from a single gene. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40:285-296.
- Skov, L.; Hansen, H.; Allen, M.; Villadsen, L.; Norval, M.; Barker, J.N.; Simon, J. y Baadsgaard, O. (1998). Contrasting effects of ultraviolet A1 and ultraviolet B exposure on the induction of tumour necrosis factor-alpha in human skin. *Br. J. Dermatol.* 138:216-220.
- Spinella, F.; Rosano, L.; Di Castro, V.; Decandia, S.; Nicotra, M.R.; Natali, P.G. y Bagnato, A. (2007). Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1alpha in human melanoma cells. *Cancer. Res.* 67:1725-1734.
- Sobue, K.; Fujio, Y. y Kanda, K. (1988). Tumor promoter induces reorganization of actin filaments and caldesmon (fodrin or nonerythroid spectrin) in 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85:482-486.
- Sokolovsky, M. (1992). Structure-function relationships of endothelins, sarafotoxins, and their receptor subtypes. *J. Neurochem.* 59:809-821.
- Stierner, U. (1991). Melanocytes, moles and melanoma-a study on UV effects. *Xenopus laevis.* 168:1-31.
- Stossel, T.P. (1989). From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. *J. Biol. Chem.* 264:18261-18264.
- Sundler, F.; Ekblad, E.; Grunditz, T.; Hakanson, R. y Uddman, R. (1988). Vasoactive intestinal peptide in the peripheral nervous system. *Ann. New. York. Acad. Sci.* 527:143-167.
- Swope, V.B.; Abdel-Malek, Z.; Kassem, L.M. y Nordlund, J.J. (1991). Interleukins 1 alpha and 6 and tumor necrosis factor-alpha are paracrine inhibitors of human melanocyte proliferation and melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 96:180-185.
- Takahashi-Iwanaga, H. y Fujita, T. (1985). Lamina propria of intestinal mucosa as a typical reticular tissue. A scanning electron-microscopic study of the rat jejunum. *Cell Tissue Res.* 242:57-66.
- Takahashi, K.; Jones, P.M.; Kanse, S. M.; Lam, H.C.; Spokes, R. A.; Ghatei, M.A. y Bloom, S.R. (1990). Endothelin in the gastro intestinal tract: Presence of endothelin like immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology.* 99:1660-1667.

- Takizawa, S.; Uchide, T.; Kozakai, T.; Adur, J.; Quan, J. y Saida, K. (2004). Immunolocalization of Endothelin-B Receptor in Mouse Intestinal Tract. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44:S329-S331.
- Takizawa, S.; Uchide, T.; Adur, J.; Kozakai, T.; Kotake-Nara, E.; Quan, J. y Saida, K. (2005). Differential expression of endothelin-2 along the mouse intestinal tract. *J. Mol. Endocrinol.* 35:201-209.
- Thellin, O.; Zorzi, W.; Lakaye, B.; De Borman, B.; Coumans, B.; Hennen, G.; Grisar, T.; Igout, A. y Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 75:291-295.
- Thomas, P.B.; Liu, E.C.; Webb, M.L.; Mukherjee, R.; Hebbar, L. y Spinale, F.G. (1996). Exogenous effects and endogenous production of endothelin in cardiac myocytes: potential significance in heart failure. *Am. J. Physiol.* 271:H2629-H2637.
- Toyoda, H.; Ina, K.; Kitamura, H.; Tsuda, T. y Shimada, T. (1997). Organization of the lamina propria mucosae of rat intestinal mucosa, with special reference to the subepithelial connective tissue. *Acta. Anat. (Basel).* 158:172-184.
- Trentin, P. G.; Fernandes, M. B.; D' Orleans-Juste, P. y Rae, G. A. (2006). Endothelin-1 causes pruritus in mice. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 231:1146-51.
- Tsang, M.C.; Lo, A.C.; Chan, T.S.; Chung, S.S. y Chung, S.K. (2005). Expression of a neuropeptide, endothelin-1 in pons and medulla of prenatal and perinatal mouse brains. *Int. J. Neurosci.* 115:1485-1501.
- Tsuboi, R.; Sato, C.; Shi, C.M.; Nakamura, T.; Sakurai, T. y Ogawa, H. (1994). Endothelin-1 acts as an autocrine growth factor for normal human keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* 159: 213-220.
- Tsuboi, R.; Sato, C.; Oshita, Y.; Hama, H.; Sakurai, T. y Goto, K. (1995). Ultraviolet B irradiation increases endothelin-1 and endothelin receptor expression in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett.* 371:188-190.
- Tsunoda, H.; Miyauch, T.; Fujita, K.; Kubo, T. y Goto, K. (1993). Mechanism of rat uterine smooth muscle contraction induced by endothelin-1. *Br. J. Pharmacol.* 110:1437-1446.
- Turner, C.E. y Burridge, K. (1991). Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 3:849-853.
- Uchide, T.; Masuda, H.; Mitsui, Y. y Saida, K. (1999). Gene expression of vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 in ovary, uterus and embryo: comprehensive gene expression profiles of the endothelin ligand-receptor system revealed by semi-quantitative reverse

- transcription-polymerase chain reaction analysis in adult mouse tissues and during late embryonic development. *J. Mol. Endocrinol.* 22:161-171.
- Uchide, T.; Adur, J.; Fukamachi, T. y Saida, K. (2000a). Quantitative analysis of endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 gene expression in rats by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36:S5-S8.
  - Uchide, T.; Masuda, H.; Lee, Y.S.; Makiyama, Y.; Mitsui, Y. y Saida, K. (2000b). Fluctuating gene expression and localized cellular distribution of vasoactive intestinal contractor (VIC) in mouse uterus. *J. Histochem. Cytochem.* 48:699-707.
  - Uchide, T.; Adur, J. y Saida, K. (2001a). Rapid quantification of murine endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor gene expression levels by a real-time PCR system. *J. Biotechnol.* 84:187-192.
  - Uchide, T.; Adur, J.; Yoshioka, K.; Sasaki, T.; Temma, K. y Saida, K. (2001b). Endothelin-1 in smooth muscle cells and mast cells of mouse uterus after parturition. *J. Mol. Endocrinol.* 27:165-173.
  - Uchide, T.; Fujimori, Y.; Sasaki, T.; Temma, K.; Adur, J.; Masuo, Y.; Kozakai, T.; Lee, Y.S. y Saida, K. (2002). Expression of endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor genes in mouse organs during the perinatal period. *Clin. Sci.* 48:167S-170S.
  - Uchide, T.; Fujimori, Y.; Temma, K.; Sasaki, T. y Saida, K. (2003). Cloning of bovine preproendothelin-2 cDNA and organ distribution of transcripts. *DNA Seq.* 14:385-392.
  - Uchide, T.; Fujimori, Y.; Temma, K.; Sasaki, T.; Kizaki, K.; Hara, Y.; Takizawa, S. y Saida, K. (2004). cDNA Cloning, Sequence Analysis and Organ Distribution of Horse Preproendothelin-2. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44:S430-S434.
  - Valentich, J.D.; Popov, V.; Saada, J.I. y Powell, D.W. (1997). Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am. J. Physiol.* 272:C1513-C1524.
  - Vandekerckhove, J.(1990). Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2:41-50.
  - Wallace, J.L.; Cirino, G.; De Nucci, G.; McNight, W. y MacNaughton, W.K. (1989). Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach. *Am. J. Physiol.* 256:381-385.
  - Wang, T. y Brown, M.J. (1999). mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal. Biochem.* 269:198-201.
  - Wang, X.N.; Das, S.K.; Damm, D.; Klagsbrun, M.; Abraham, J.A. y Dey, S. (1994). Differential regulation of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the adult ovariectomized mouse uterus by progesterone and estrogen. *Endocrinology* 135:1264-1271.
  - Warner, T.D.; Allcock, G.H.; Corder, R. y Vane, J.R. (1993). Use of the endothelin antagonists

BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br. J. Pharmacol.* 110:777-782.

- Watanabe, H.; Miyazaki, H.; Kondoh, M.; Masuda, Y.; Kimura, S.; Yanagisawa, M.; Masaki, T. y Murakami, K. (1989). Two distinct types of endothelin receptors are present on chick cardiac membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161:1252-1259.

- Weeds, A. y Maciver, S. (1993). F-actin capping proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5:63-69.

- Winer, J.; Jung, C.K.; Shackel, I. y Williams, P.M. (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal. Biochem.* 270:41-49.

- Wu, C.Y.; Kaur, C.; Lu, J.; Cao, Q.; Guo, C.H.; Zhou, Y.; Sivakumar, V. y Ling, E.A. (2006). Transient expression of endothelins in the amoeboid microglial cells in the developing rat brain. *Glia.* 54:513-525.

- Yada, Y.; Higuchi, K. e Imokawa, G. (1991). Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* 266:18352-18357.

- Yamamura, H.; Nabe, T.; Kohno, S. y Ohata, K. (1994). Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. *Eur. J. Pharmacol.* 265:9-15.

- Yanagisawa, M.; Kurihara, H.; Kimura, S.; Tomobe, Y.; Kobayashi, M.; Mitsui, Y.; Yazaki, K.; Goto, Y. y Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415.

- Yarosh, D.B.; Kibitel, J.; Ullrich, S.E.; Kim, T.H.; Ananthaswamy, H.N. y Krien, P. (1999). Direct comparison of DNA damage, isomerization of urocanic acid and edema in the mouse produced by three commonly used artificial UV light sources. *Photochem. Photobiol.* 69: 571-574.

- Yohn, J.J.; Morelli, J.G.; Walchak, S.J.; Rundell, K.B.; Norris, D.A. y Zamora, M.R. (1993). Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1. *J. Invest. Dermatol.* 100: 23-26.

- Yoshida, H.; Kunisada, T.; Kusakabe, M.; Nishikawa, S. y Nishikawa, S.I. (1996). Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Development.* 122:1207-1214.

- Yoshinaga, M.; Chijiwa, Y.; Misawa, T.; Harada, N. y Nawata, H. (1992). EndothelinB receptor on guinea pig small intestinal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 262:G308-G311.

- Yoshizawa, T.; Shinmi, O.; Giaid, A.; Yanagisawa, M.; Gibson, S.J.; Kimura, S.; Uchiyama, Y.; Polak, J.M.; Masaki, T. y Kanazawa, I. (1990). Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system. *Science.* 247:462-464.

- Young, S.G.; Smith, R.S.; Hogle, D.M.; Curtiss, L.K. y Witztum, J.L. (1986). Two new monoclonal antibody-based enzyme-linked assays of Apolipoprotein B. *Clin. Chem.* 32:1484-1490.
- Yuan, A.; Yu, C.J.; Luh, K.T.; Chen, W.J.; Lin, F.Y.; Kuo, S.H. y Yang, P.C. (2000). Quantification of VEGF mRNA expression in non-small cell lung cancer using a real-time quantitative competitive reverse transcription-PCR assay and a comparison with quantitative competitive reverse transcription-PCR. *Lab. Invest.* 80:1671-1680.
- Zhang, S.; Troyer, D.L.; Kapil, S.; Zheng, L.; Kennedy, G.; Weiss, M.; Xue, W.; Wood, C. y Minocha, H.C. (1997). Detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in bovine tissues by polymerase chain reaction (PCR) and PCR in situ hybridization. *Virology.* 236: 249-257.
- Zhang, Z.; Funk, C.; Roy, C.; Glasser, S. y Mulholland, J. (1994). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is differentially regulated by progesterone and estradiol in rat uterine epithelial and stromal cells. *Endocrinology.* 134:1089-1094.
- Zhang, Z.; Laping, J.; Glasser, S.; Day, P. y Mulholland, J. (1998). Mediators of estradiol-stimulating mitosis in the rat uterine luminal epithelium. *Endocrinology.* 139:961-966.
- Zhang, Y.; Tang, L.; Su, M.; Eisen, D.; Zloty, D.; Warshawski, L. y Zhou, Y. (2006). Expression of endothelins and their receptors in nonmelanoma skin cancers. *J. Cutan. Med. Surg.* 10:269-276.
- Zuidervaart, W.; van der Velden, P.A.; Hurks, M.H.; van Nieuwpoort, F.A.; Out-Luiting, C.J.; Singh, A.D.; Frants, R.R.; Jager, M.J. y Gruis, N.A. (2003). Gene expression profiling identifies tumour markers potentially playing a role in uveal melanoma development. *Br. J. Cancer.* 89: 1914–1919.