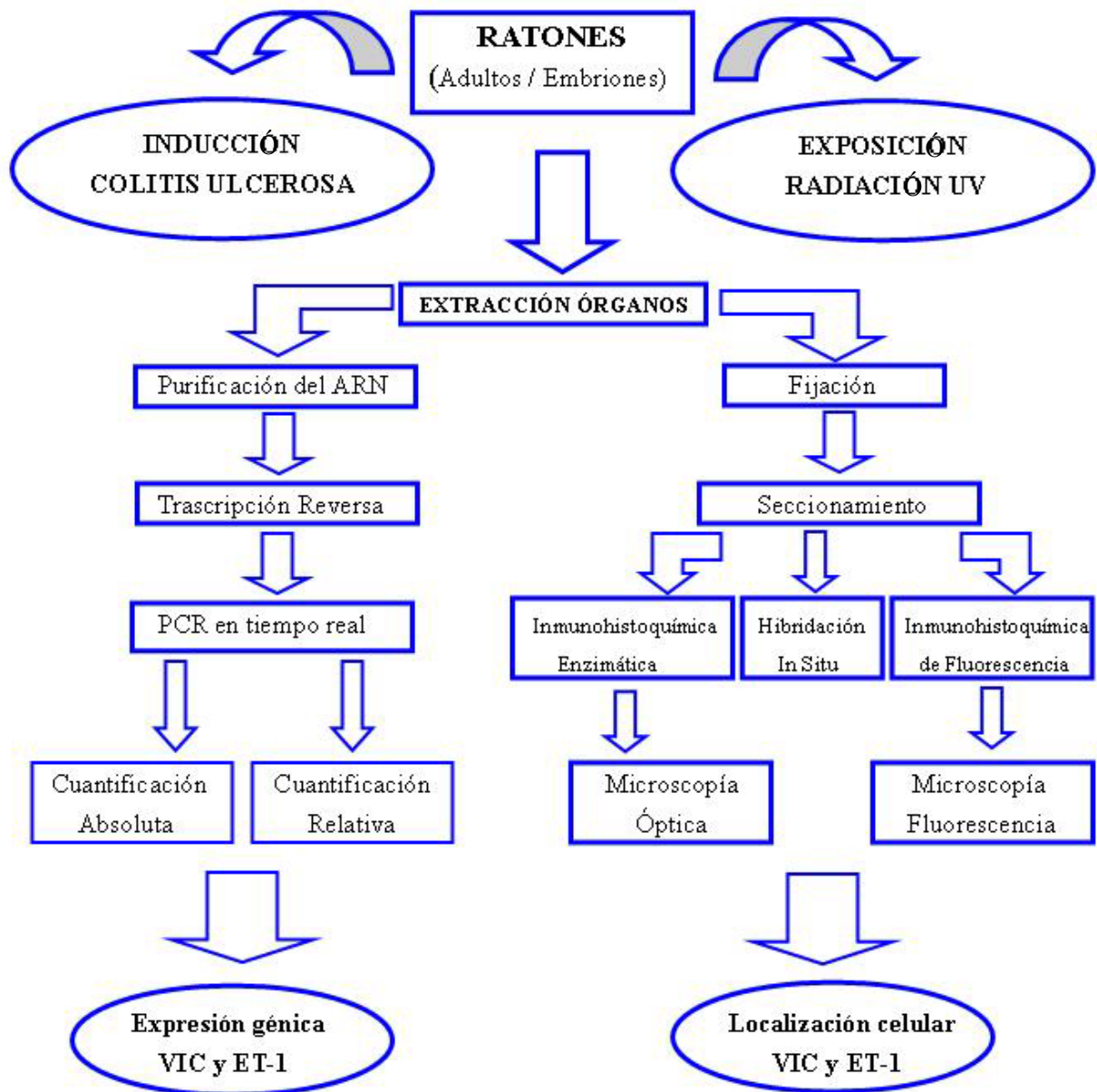


### III – MATERIALES Y MÉTODOS

El siguiente diagrama presenta en forma resumida los materiales, pasos y técnicas utilizadas en el presente trabajo.



### **III.1 – ANIMALES UTILIZADOS**

En los presentes estudios se utilizaron ratones de la línea ICR, adquiridos en Clea Japan Inc. (Tokyo, Japón) tanto juveniles (entre 7 y 10 semanas de edad) como adultos (más de 25 semanas). Con un peso promedio de 10 gr y 30 gr cada uno respectivamente. En todos los casos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente fueron removidos los siguientes órganos: cerebro (Cer), cerebelo (Cel), corazón (Cor), pulmón (Pul), hígado (Hig), riñón (Rin), bazo (Baz), ovario (Ova), útero (Ute), testículo (Tes), estómago (Est), duodeno (Duo), yeyuno (Yey), íleon (Ile), colon (Col), recto (Rec) y piel (Pil) de la zona dorsal. Estos órganos fueron lavados en una solución helada de PBS (buffer fosfato salino) pH 7,0 pesados y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la purificación del ARN.

Para la obtención de embriones y neonatos, se consideró como día 0 de preñez aquel en el que se observó el tapón vaginal. En la mayoría de los tejidos se utilizaron embriones de 7 (E7), 8 (E8), 9 (E9), 10 (E10), 12 (E12), 14 (E14) y 17 (E17) días y neonatos de 0 (N0) considerando el momento del parto y de 1 (N1), 3 (N3), 7 (N7) y 14 (N14) días después del parto. En todos los casos se extrajeron los siguientes órganos: cerebro (Cer), corazón (Cor), pulmón (Pul), hígado (Hig), riñón (Rin), intestino (Int) y piel (Pil) de la zona dorsal. Para los estudios de pulmón se realizó un análisis más exhaustivo, utilizándose neonatos a las 0; 0,5; 1; 3; 6; 12; 18 y 24 horas. Las muestras fueron tratadas como se explicó anteriormente y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la purificación del ARN.

Las metodologías particulares empleadas en la extracción de tejidos, o los procedimientos experimentales particulares, se explicarán brevemente en la sección de resultados o eventualmente, en los pie de figura respectivos.

### **III.2 – PURIFICACIÓN DEL ARN**

Las diferentes muestras de los órganos fueron descongeladas y homogeneizadas usando jeringas de 1 ml con 1000  $\mu\text{l}$  de solución ISOGEN (Nipón Gene, Japón). A estas muestras se les adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo, se mezclaron vigorosamente y se centrifugaron a 12.000g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  fueron transferidas a nuevos tubos y se adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol, se mezclaron y se dejaron en hielo por 30 minutos, luego se centrifugaron a 12.000g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fase acuosa fue removida y al precipitado de ARN se le agregaron 900  $\mu\text{l}$  de etanol al 80%. Esta solución se centrifugó a 7.500g durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y luego de la centrifugación, el etanol fue removido y el

precipitado con el ARN fue disuelto en H<sub>2</sub>O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La concentración de ARN fue medida leyendo la absorbancia a 260 nm (A<sub>260</sub>) y a 280 nm (A<sub>280</sub>) en un espectrofotómetro, las relaciones de A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> = 1,7 – 1,9 fueron consideradas óptimas. Las muestras de ARN fueron diluidas usando H<sub>2</sub>O tratada con DEPC hasta una concentración de 1 µg/µl para el procesamiento y posterior obtención del ADN complementario (ADNc).

### **III.3 –ADN COMPLEMENTARIO. TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

El ADNc fue obtenido por transcripción reversa utilizando el equipo de ARN PCR AMV (Ver. 2.1, Takara Biomedicals, Japan): 1 µl del ARN obtenido del proceso de purificación descrito anteriormente, fue mezclado con 4 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de *buffer* para PCR 10X, 8,5 µl de dH<sub>2</sub>O libre de ARNasas, 2 µl de una mezcla de dNTP, 1 µl de un cebador con secuencia aleatoria, 0,5 µl de inhibidor de ARNasas y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa. Luego de una centrifugación rápida, las muestras fueron llevadas a las siguientes condiciones de transcripción reversa: 30°C por 10 minutos, 42°C por 30 minutos y 99 °C por 5 minutos.

### **III.4 – AMPLIFICACIÓN EN TIEMPO REAL DEL ADN**

Las muestras de ADNc obtenidas luego de la transcripción reversa fueron procesadas, para realizar la amplificación y posterior cuantificación de los transcritos de los genes VIC/ET-2, ET-1, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. La amplificación se realizó utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*real-time PCR*).

#### **III.4 – a) Componentes utilizados en la reacción**

La reacción fue optimizada para cada uno de los diferentes conjuntos de cebadores y muestras de ADNc. Para ello, se variaron las condiciones de los ciclos de la PCR y las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, enzima *AmpliTaq Gold*, nucleótidos (dNTP), cebadores y sonda fluorescente.

Para optimizar la mezcla madre, la concentración de MgCl<sub>2</sub> fue analizada en un rango entre 2 mM y 10 mM. Dichos valores fueron seleccionados evaluando tanto las curvas de amplificación, como los geles de agarosa. Se consideró como valor óptimo al que produce la mayor intensidad de emisión de fluorescencia en el proceso de amplificación y simultáneamente al que presenta sobre el gel un único producto de amplificación del tamaño esperado. La enzima fue evaluada para concentraciones entre 0,015 U/µl a 0,085 U/µl. La enzima utilizada (*AmpliTaq Gold*) es una versión modificada de la enzima recombinante *AmpliTaq* ADN polimerasa. La misma requiere un paso de activación de 9 a 12 minutos a 95°C antes de comenzar con la PCR. Una vez activada,

la enzima *AmpliTaq Gold* exhibe la misma actividad por unidad, la misma estabilidad térmica y la misma vida media a 95°C que la *AmpliTaq* ADN polimerasa. Por lo tanto en un sistema de PCR ya optimizado la *AmpliTaq* fue sustituida unidad por unidad por la *AmpliTaq Gold* ADN polimerasa. Las concentraciones de los diferentes nucleótidos se seleccionaron de manera que se mantuviesen balanceados, para evitar que la enzima realice una incorrecta incorporación, reduzca su efectividad y termine su proceso prematuramente. La concentración del nucleótido dUTP se duplicó en relación con los otros desoxirribonucleótidos.

Utilizando el equipo *TaqMan PCR Core Reagent* (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, USA) y considerando los parámetros de optimización antes mencionados; los diferentes componentes del mismo y sus concentraciones fueron seleccionados y mezclados de la siguiente manera:

- 10,375 µl de agua bidestilada tratada con DEPC,
- 2,5 µl del Buffer *TaqMan* 1X,
- 0,5 µl de dATP 200 µM,
- 0,5 µl de dGTP 200 µM,
- 0,5 µl de dCTP 200 µM,
- 0,5 µl de dUTP 400 µM,
- 3,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM y
- 0,125 µl de la enzima *AmpliTaq Gold* (0,025 U/µl).

El volumen total de mezcla madre fue de 18,5 µl, a ésta se le agregaron posteriormente los cebadores (directo y reverso) y la sonda fluorescente.

#### **III.4 – b) Diseño de los cebadores**

La selección de los cebadores fue realizada estimando la temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) de los mismos. Para obtener especificaciones exactas se utilizó el programa *Primer Express* (ABI-Perkin Elmer), provisto por el sistema *TaqMan*. Para cada uno de los genes a estudiar, se eligió una secuencia que tuviese al menos un intrón intercalado para evitar la detección y amplificación de ADN genómico contaminante. En el diseño de los cebadores se tuvieron en cuenta las siguientes premisas: longitud en el rango de 15 a 30 pb conteniendo proporción de los nucleótidos G+C del orden del 50%. Asimismo, la T<sub>f</sub> no difirió en más de 1°C ó 2°C de un mínimo y máximo T<sub>f</sub> de 58°C y 60°C respectivamente. La concentración de los mismos estuvo

en el rango de 50 a 200 nM. Las concentraciones muy bajas no constituyen un problema serio, pero concentraciones muy altas pueden producir alineamientos inadecuados y acumulación de productos no específicos. La concentración final utilizada en la reacción para cada cebador fue de 200 nM.

Los oligonucleótidos de los cebadores específicos para cada uno de los genes evaluados en el presente trabajo son listados en la tabla IV, donde se indican sus secuencias, sus longitudes y los tamaños de los productos esperados.

De cada par de cebadores, se agregaron a la mezcla madre 0,5 µl del cebador directo y 0,5 µl del cebador reverso, obteniéndose así, un volumen total de 19,5 µl.

### **III.4 – c) Diseño de la sonda fluorescente**

La sonda fue diseñada utilizando el mismo software empleado para los cebadores, siguiendo los siguientes requisitos: la secuencia elegida debía hibridar en una zona que comprendiese a los cebadores y poseer una longitud entre 20 a 30 pb, con un porcentaje de G+C entre 40 y 60%, la  $T_f$  debía estar entre 5°C y 10°C por encima de la  $T_f$  de los cebadores, debiendo evitarse el solapamiento con los cebadores en los dos sentidos. Se buscó que la secuencia tuviese más de tres o cuatro nucleótidos repetidos seguidos y que el nucleótido dGTP estuviese en el extremo 5'. La concentración óptima de la sonda fluorescente depende de la fluorescencia de fondo y de la concentración de los cebadores. Para maximizar la señal, se varió la concentración de la sonda en un rango desde los 50 nM a 200 nM.

Las sondas fueron marcadas utilizando como marcador donante fluorescente en el extremo 5' a la 6-carboxi-fluoresceína (FAM) y como marcador fluorescente aceptor en el extremo 3' a la 6-carboxitetrametil-rodamina (TAMRA). Los oligonucleótidos específicos de las sondas fluorescentes para cada uno de los genes evaluados en el presente trabajo son listados en la tabla IV, donde se indican sus secuencias y longitudes.

En cada caso se agregaron a la mezcla madre 0,5 µl de la sonda con lo que el volumen total del cóctel fue de 20 µl.

Tabla IV: Secuencia específica de los cebadores y las sondas utilizados para cada uno de los genes de la familia endotelinas.

Gen	Cebadores-Sonda	Secuencia	Long (pb)	PCR (pb)
VIC/ET-2	Directo	5'-CTGCGTTTTTCGTCGTTGCT-3'	19	422
	Reverso	5'-TGCAGCTCATGGTGTATCTCTTC-3'	24	
	Sonda	5'-FAM-CTGCAACTCCTGGCTTGACAAGGAA-TAMRA-3'	25	
ET-1	Directo	5'-TTCCCGTGATCTTCTCTCTGCT-3'	22	370
	Reverso	5'-TCTGCTTGGCAGAAATTCCA-3'	20	
	Sonda	5'-FAM-ACAAGGAGTGTGTCTACTTCTGCCACCTGG-TAMRA-3'	30	
ET <sub>A</sub>	Directo	5'-GCTGGTTCCTCTTCACTTAAGC-3'	23	129
	Reverso	5'-TCATGGTTGCCAGGTTAATGC-3'	21	
	Sonda	5'-FAM-AACCGGTGTGAACTGCTCAGCTTCTTG-TAMRA-3'	27	
ET <sub>B</sub>	Directo	5'-TGTGCTCTAAGTATTGACAGATATCGAG-3'	28	240
	Reverso	5'-GGCTGTCTTGAAAAGTGCATGA-3'	23	
	Sonda	5'-FAM-AGCCAGAACCACAGAGACCACCCAAA-TAMRA-3'	25	
GAPDH	Directo	5'-CTTCACCACCATGGAGAAGGC-3'	21	238
	Reverso	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	21	
	Sonda	5'-FAM-CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTT-TAMRA-3'	28	

### III.4 – d) Instrumentación y condiciones de la amplificación

Para realizar la amplificación se agregaron secuencialmente los siguientes compuestos: 18,5 µl de la mezcla madre + 0,5 µl cebador directo + 0,5 µl cebador reverso + 0,5 µl de la sonda fluorescente + 5 µl del ADNc patrón conteniendo VIC/ET-2, ET-1, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, hasta completar un volumen final de 25 µl. Para el gen utilizado en la normalización, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), se preparó el mismo volumen en las mismas condiciones. La amplificación se llevó a cabo en dos etapas. La primera, requerida para realizar la activación de la enzima *AmpliTaq Gold*, se realizó durante 10 minutos a 95°C. La segunda etapa consistió de 50 ciclos de dos pasos cada uno; el primero para separar las cadenas de ADNc se realizó durante 20 segundos a 95°C y el segundo paso, que posibilita el apareamiento de los cebadores con la hebra patrón, inicia la polimerización y completa el proceso de síntesis o extensión; se realizó durante 2 minutos a 62°C. Estos dos cambios de temperatura en los

sucesivos ciclos de la PCR presentan un incremento específico de la señal fluorescente del blanco si se lo compara con un sistema de tres cambios de temperatura. En la tabla V se resumen las condiciones en que se efectuó la amplificación.

El proceso se llevó a cabo con el sistema ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dotado de un termociclador con un porta muestras de 96 celdas y detección de fluorescencia entre los 500 nm y 660 nm.

Tabla V: Condiciones de la reacción

CICLOS	ETAPAS	TIEMPO	TEMPERATURA
1	1	10 minutos	95°C
50	2-1	20 segundos	95°C
	2-2	2 minutos	62°C

### III.5 – CUANTIFICACIÓN DE LA FLUORESCENCIA EN TIEMPO REAL

#### III.5-a) Análisis de la amplificación

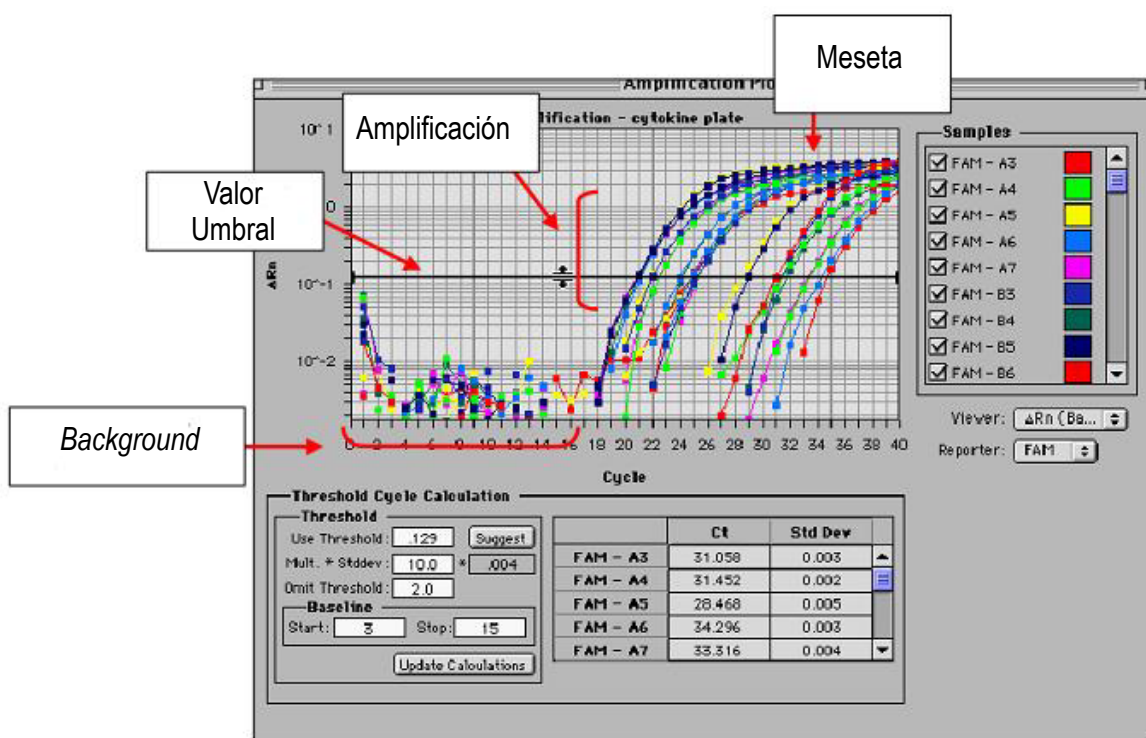
Para obtener una cuantificación precisa de la cantidad de ADNc presente en cada una de las muestras, usando el algoritmo del sistema de detección se fijaron tres parámetros: la línea base, el umbral y el ciclo umbral (Ct) –ciclo de la PCR a partir del cuál se produce dicho umbral–.

Las variaciones de los niveles de fluorescencia, debidos a los cambios que se producen en el transcurso de la reacción, fueron visualizadas como señales de fondo (o *background*). Esta señal fue muy evidente en los ciclos iniciales de la PCR (3 a 15), antes de comenzar la acumulación del producto a amplificar. Durante los primeros ciclos, la señal fluorescente de todas las celdas fue utilizada para calcular el valor de la línea base de fluorescencia a lo largo de todo el porta muestra. El umbral, es un valor numérico que se asigna en cada corrida de la reacción. Finalmente el ciclo umbral (Ct) al cuál se produce este punto, refleja el número del ciclo en el cuál la señal fluorescente generada durante la reacción sobrepasa el umbral. En la figura 8 se muestra un ejemplo de los parámetros mencionados, luego de realizada una corrida típica de PCR.

Una vez determinada la línea base, el programa calcula automáticamente el umbral en un valor igual a 10 veces la desviación estándar del valor medio de la línea base de fluorescencia. En este

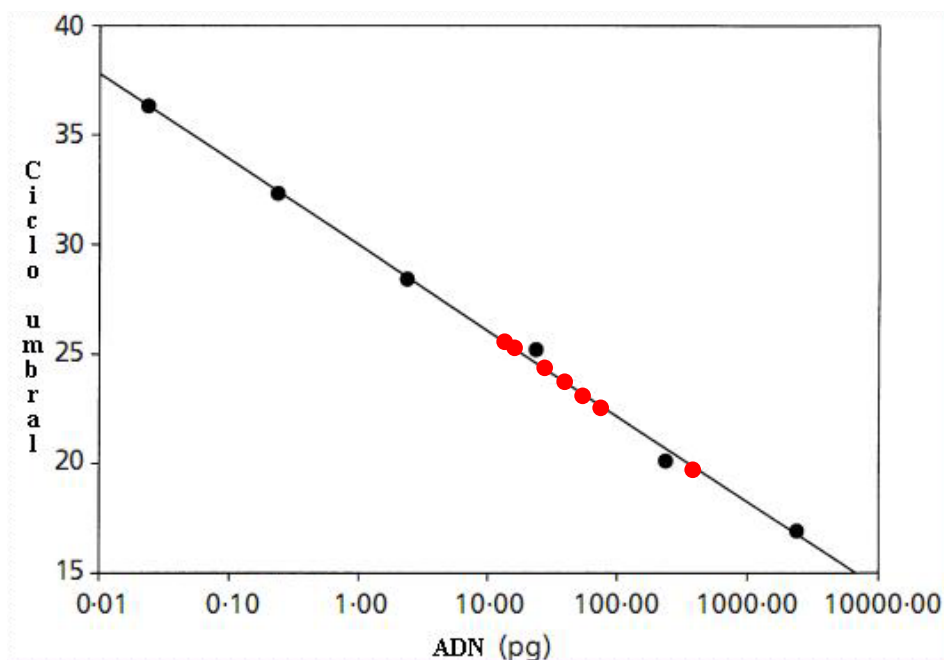
punto, el umbral fue ajustado manualmente colocando el cursor sobre la línea umbral (Fig. 8) deslizando a lo largo de la curva de amplificación verificando que se ubique en la región exponencial de la amplificación y atravesando todas las curvas (Fig. 8).

Finalmente, se determinó un valor de Ct; el cuál fue trasladado como un dato cuantitativo construyendo una curva estándar; que representa la amplificación generada utilizando muestras en las que el número de copias de ADN se conocía con anterioridad. Usando 4 ó 5 concentraciones conocidas de un mismo patrón, se determinó el Ct para cada uno. Luego se graficó el Ct en función de la concentración inicial generando una curva estándar (ver círculos negros en la figura 9). La concentración incógnita se calculó por interpolación utilizando la curva estándar, tomando un valor de Ct para una muestra desconocida (ver círculos rojos en la figura 9).



**Figura 8:** Parámetros fundamentales utilizados para cuantificar la fluorescencia producida durante la amplificación. En el eje Y se grafica la cantidad de fluorescencia detectada por el sistema en función de los ciclos de la PCR que se presentan en el eje X. (Modificado de Data Analysis on the ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System, 2002).





**Figura 9:** Curva estándar (Ct vs. Concentración de ADN) generada con puntos cuya concentración es conocida (círculos negros). La concentración de las muestras incógnitas (círculos rojos), se calcula por interpolación.

### III.5-b) Cuantificación

La cuantificación puede ser absoluta o relativa. La primera determina el número exacto de copias de ADN presentes en cada una de las muestras de interés, usualmente relacionando la señal de la PCR con la curva estándar. En este caso, los puntos de la curva estándar representan muestras cuya cantidad de ADN se conoce exactamente. La cuantificación relativa por su parte, describe los cambios en la expresión génica del gen patrón relativo a un grupo de referencia por ejemplo, un grupo sin tratamiento (control) o una muestra a tiempo cero en un estudio dinámico. Al igual que en la cuantificación absoluta, aquí se puede utilizar una curva estándar. La diferencia radica en que los puntos utilizados para realizar la curva son muestras que se sabe poseen el gen a cuantificar, pero cuya concentración exacta no es necesario conocer. Otra forma de realizar la cuantificación relativa es utilizando el método denominado  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### III.5-b.1) Cuantificación absoluta

Este método fue aplicado en los experimentos en que se determinó la expresión génica de las ETs en diferentes órganos de ratones adultos. El número de moléculas iniciales de ADNc en cada una de las muestras fue determinado. El índice de expresión génica para VIC/ET-2, ET-1, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> se definió como la razón del número de moléculas de ADNc de VIC/ET-2 o ET-1 o ET<sub>A</sub> o ET<sub>B</sub>

con respecto al número de moléculas del ADNc de GAPDH, multiplicado por 100. El gen de la GAPDH existe en todos los tejidos exhibiendo un nivel de expresión considerado constante, por lo que se lo usó como control interno permitiendo normalizar las diferencias en la calidad y la cantidad del ADNc obtenido, utilizando la transcripción reversa aplicada a los ARNms extraídos de cada uno de los diferentes tejidos. Resumiendo, el índice de expresión génica fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice} = [\text{n}^\circ \text{ de moléculas de (ligandos o receptores)} / \text{n}^\circ \text{ de moléculas de GAPDH}] \times 100$$

Para realizar la curva estándar, los ADNcs de ratón para VIC/ET-2, ET-1, ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> y GAPDH fueron clonados mediante el rastreo en una librería de ADNc del laboratorio (Saida y Mitsui, 1991; Kurama et al., 1996). Los fragmentos de restricción y los productos de las PCRs fueron clonados en el plásmido pCR-Script SK usando un equipo de clonación tradicional (Stratagene, La Jolla, USA), siguiendo el protocolo de los fabricantes. Los productos fueron secuenciados usando el método de Sanger (didesoxi) con el equipo de secuenciación de ADN 373A (PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Los ADNcs de las diferentes muestras, insertados en los plásmidos, fueron posteriormente cuantificados y diluidos en las siguientes proporciones: VIC/ET-2, ET-1, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> de  $6,3 \times 10^7$  moléculas/ $\mu\text{g}$  a  $6,3 \times 10^1$  moléculas/ $\mu\text{g}$ . Por su parte GAPDH fue diluido de  $2,7 \times 10^7$  moléculas/ $\mu\text{g}$  a  $2,7 \times 10^1$  moléculas/ $\mu\text{g}$ .

La curva estándar fue generada realizando tres experimentos independientes en todo el rango de diluciones y por duplicado en cada una de éstas, en paralelo con las muestras patrón y las utilizadas como control. Las diluciones se seleccionaron barriendo el rango del número de copias que se esperaba que existiesen en el ADNc de la muestra patrón. Los valores superior e inferior del Ct fueron descartados para corregir los errores de pipeteo, conservándose los restantes para generar la curva. Siendo el valor de Ct inversamente proporcional al logaritmo del número inicial de copias (Higuchi y col., 1993), la curva estándar fue generada graficando el valor de Ct, en intervalos de confianza del 95%, a lo largo del logaritmo del número de copias. El número de copias de las muestras incógnitas, como se mencionó más arriba, se calculó luego de la amplificación por regresión lineal utilizando dicha curva.

### **III.5-b.2) Cuantificación relativa**

Este método se utilizó para determinar la cantidad de VIC/ET-2, ET-1, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en los diferentes órganos durante el desarrollo embrionario y en algunos de los estudios dinámicos. Dicho cálculo se realizó por los métodos de la curva estándar y el denominado  $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ .

El método de la curva estándar es similar al realizado en la cuantificación absoluta, excepto por que se desconoce el número exacto de copias de cada muestra. Para levantar los puntos de la curva estándar no fue necesario realizar una clonación ni secuenciación de los productos. La curva se efectuó utilizando diferentes diluciones de ADNc provenientes del útero de ratón. Se eligió este órgano, pues la expresión génica de los ligandos y receptores es considerablemente alta. Diluciones entre 0,01 ng a 1.000 ng para ET<sub>A</sub>, entre 0,001 a 100 ng para ET<sub>B</sub>, entre 0,01 a 10.000 para VIC/ET-2, ET-1 y GAPDH fueron sintetizados por la reacción en tiempo real y los valores de Ct resultantes fueron utilizados para construir la curva estándar. Finalmente, el índice de expresión génica fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice} = [\text{n}^\circ \text{ de moléculas de (ligandos o receptores)} / \text{n}^\circ \text{ de moléculas de GAPH}] \times 100$$

El método  $2[-\Delta\Delta C(t)]$  fue descrito en sus comienzos por K.J. Livak y posteriormente definido matemáticamente (Livak, 1997; Livak y Schmittgen, 2001). Brevemente, el método es similar al de la curva estándar, excepto en que usa una fórmula aritmética para obtener la cuantificación. La fórmula utilizada para obtener la cantidad de ADNc de la muestra patrón, normalizada a una referencia (GAPDH) y relativa a un calibrador es:

$$\text{Cantidad de la muestra} = 2^{\Delta\Delta C_t}$$

donde, Ct es el número del ciclo umbral y  $\Delta\Delta C_t = [Ct_{\text{muestra patrón (desconocida)}} - Ct_{\text{referencia (desconocida)}}] - [Ct_{\text{muestra patrón (calibrador)}} - Ct_{\text{referencia (calibrador)}}]$ . Como se mencionó anteriormente GAPDH fue seleccionado como gen normalizador, pues ha sido ampliamente utilizado en estudios similares a los aquí implementados (Uchide y col., 1999, Uchide y col., 2000a y Uchide y col., 2002; Saida y col., 2000). Por su parte, la muestra utilizada como calibrador puede ser cualquiera que represente la unidad de cambio de la expresión y es utilizada luego para comparación. El cálculo de  $\Delta\Delta C_t$  se realizó suponiendo que la reacción tiene una eficiencia del 100% y que cada gen que se comparó tenía la misma pendiente. La eficiencia de la amplificación fue calculada utilizando la fórmula  $E = 10^{[1/- \text{pendiente}]}$ .

En el Anexo se presentan todos los pasos realizados en una de las determinaciones. Se presenta el portamuestra con las 96 celdas y cómo se dispusieron las respectivas muestras estándar, control e incógnitas para realizar la cuantificación. Se presentan también los gráficos y datos arrojados por el programa.

### III.6) ANÁLISIS HISTOQUÍMICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS

Luego de evaluar diferentes condiciones de trabajo en una serie de experimentos preliminares, se seleccionaron los siguientes protocolos.

#### III.6-a) Intestino

Los segmentos intestinales de los distintos especímenes fueron fijados utilizando paraformaldehído al 2% y ácido pícrico saturado al 15% en 0,15 M PBS (pH 7,3; 4°C; 2 horas) y luego embebidos a temperatura óptima de corte en el compuesto OCT (Tissue-Tek, Torrance, CA, USA) y congelados en hielo seco. La inmunorreacción para VIC/ET-2 fue realizada en secciones de crióstato de 8 µm (HM500-OM, Microm, Alemania), cuya inespecificidad fue bloqueada con suero de cabra normal, inactivado por calor en PBS-0,1% azida sódica. Se utilizó un anticuerpo primario anti-VIC hecho en conejo (tabla VI) y como secundario un anticuerpo biotinilado anti conejo (IgG) hecho en cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA.). Las secciones fueron tratadas por 30 minutos a temperatura ambiente en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 % en metanol, después de la reacción con el primer anticuerpo. Las inmunorreacciones se realizaron usando el equipo comercial (Vectastain ABC Kit, Vector Lab., Burlingame, CA, USA). Brevemente, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron por 30 minutos en PBS con suero normal de cabra al 10% para bloquear los sitios de reacción inespecíficos. Luego, las secciones fueron incubadas por 60 minutos con los anticuerpos primarios de conejo a una concentración de 5µg/ml a temperatura ambiente y posteriormente lavadas con PBS. Seguidamente, las secciones fueron incubadas por 30 minutos con los anticuerpos secundarios biotinilados de cabra anti-conejo (IgG) a temperatura ambiente, nuevamente lavados con PBS y tratados por 30 minutos con el complejo peroxidasa estreptavidina-biotina a temperatura ambiente. El complejo fue visualizado con una solución de 3-3'diaminobenzidina (DAB).

Para los estudios de inmunofluorescencia las secciones fueron incubadas con anti-VIC y anti-VIP (Péptido Intestinal Vasoactivo) (tabla VI), durante toda la noche. Luego del lavado con PBS, fueron aplicados FITC anti-conejo IgG de burro y RITC anti-cerdo IgG de burro, a 37°C durante 30 minutos. Luego de la marcación, las secciones fueron montadas utilizando Vectashield (Vector Laboratories) como medio de montaje.

Para la detección de las células M en la zona de Peyer's, se realizó una tinción con lectina. Para ello se utilizó el método de Giannasca con modificaciones (Giannasca y col., 1994). Las criosecciones fueron bloqueadas con BSA/PBS al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente e incubadas con 50µg/ml *Ulex europaeus agglutinin* tipo I (UEA-I; EY Laboratorios, San Meteo,

CA, USA) marcada con RITC, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego del lavado con PBS, la fluorescencia se desarrolló como se explicó previamente.

### **III.6-b) Piel**

La piel extraída de la región dorsal fue fijada en paraformaldehído al 4% en 100 mM PBS a pH 7,0 durante 1 hora a 4°C, crioprotegida en 30% sacarosa a 4°C durante toda la noche; embebidas a temperatura óptima de corte en el compuesto OCT (Tissue-Tek, Sakura, Japan) y congeladas en hielo seco. Los bloques de piel congelados fueron seccionados con un espesor de 8 µm utilizando un crióstato (HM500-OM, Microm, Alemania). Las secciones de 8 µm fueron transferidas sobre portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y secados al aire durante 15 minutos.

La inmunorreacción fue realizada como se describió para intestino, usando el equipo comercial (Vectastain ABC Kit, Vector Lab., Burlingame, CA, USA). Se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo IgG para VIC/ET-2, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> (Tabla VI). La visualización fue realizada utilizando la solución de 3-3'diaminobenzidina (DAB). También se utilizó el anticuerpo K10 para el reconocimiento de los queratinocitos.

### **III.7) HIBRIDACIÓN *IN SITU***

Se utilizaron ribosondas marcadas con digoxigenina y el equipo ISHR Starting (Nippon Gene). Los fragmentos de restricción y los productos de la PCR fueron clonados usando el plásmido pCR-Script SK acompañado de un kit de clonación tradicional (Stratagene, La Jolla, USA), siguiendo el protocolo de los fabricantes. Estos plásmidos conteniendo el ADNc de VIC/ET-2 y ET-1 fueron utilizados como molde para sintetizar las ribosondas. Estas fueron sintetizadas utilizando el DIG RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). La región del duodeno utilizada en los estudios fueron fijadas con paraformaldehído al 4%/ PBS a 4°C durante toda la noche y embebidas en el componente OCT. Se obtuvieron criosecciones de 8 µm de espesor las que fueron tratadas con los siguientes reactivos: 0,2 M de HCl durante 20 minutos a temperatura ambiente; 5 µg/ml de proteinasa K (Boehringer Mannheim) en PBS durante 10 minutos a 37 °C; 2 mg/ml de glicina in PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y acetilado con 0,25% de anhídrido acético en 0,1 M a pH 8,0 durante 15 minutos y a temperatura ambiente. Luego de la pre-hibridación con 2xSSC conteniendo 50% de formamida durante 30 minutos a 30 °C, las secciones fueron hibridadas con buffer de hibridación compuesto por: (50% formamida, 2xSSC, 1 µg/µl ARNt, 1 µg/µl de ADN de esperma de salmón, 1 µg/µl BSA y 10% sulfato dextran) conteniendo 1 µg/µl de ribosondas marcadas con digoxigenina a 50 °C durante toda la noche. Las secciones fueron incubadas con anticuerpos marcados con digoxigenina

fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim; 1:500) y se evidenciaron con Nitro Blue Tetrazolium y 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato. Las secciones fueron contrastadas con verde de metilo.

Tabla VI: Resumen de los anticuerpos utilizados en las distintas reacciones

Nº	Anticuerpo	Características	Dilución	Especificidad
1	Anti-VIC (Immuno-Biological Laboratorios, IBL. Fujioka. Japón)	Anticuerpo policlonal. Inmunoglobulina G de conejo. (IgG)	1:64	Ratón
2	Anti-ET-1 (Immuno-Biological Laboratorios, IBL. Fujioka. Japón)	Anticuerpo policlonal. Inmunoglobulina G de conejo. (IgG)	1:50	Ratón, Rata.
3	Anti-ET <sub>A</sub> (Immuno-Biological Laboratorios, IBL. Fujioka. Japón)	Anticuerpo policlonal. Inmunoglobulina G de conejo. (IgG)	1:10	Ratón, Rata
4	Anti-ET <sub>B</sub> (Immuno-Biological Laboratorios, IBL. Fujioka. Japón)	Anticuerpo policlonal. Inmunoglobulina G de conejo. (IgG)	1:50	Ratón, Rata
5	Anti-VIP (Euro-Diagnostica, Medeon, Suiza)	Anticuerpo policlonal. Inmunoglobulina G de cerdo. (IgG)	1:1000	Ratón
6	FITC (Chemicon, Temecula, CA, USA)	Anticuerpo policlonal de Burro Mono (IgG). Anti Conejo	1:200	
7	RITC (Chemicon, Temecula, CA, USA)	Anticuerpo policlonal de Burro (IgG). Anti Cerdo	1:200	
8	Keratin 10 (NeoMarkers)	Anticuerpo Monoclonal de Ratón. Inmunoglobulina G1	1:100	Humanos, Ratón, Rata, Perro y Gato.

### III.8) INDUCCIÓN DE COLITIS ULCEROSA

La inducción de colitis ulcerosa se realizó sobre ratones machos de siete semanas de edad, de la misma línea utilizada en el resto de los experimentos, siguiendo el procedimiento de Mähler y colaboradores (Mähler y col., 1998). Brevemente, se llevó a cabo *ad libitum*, suministrando por vía oral y durante 7 días sulfato de sodio dextran (ICN Biomedical, Aurora, OH, USA) disuelto en agua al 5 % en volumen.

### III.9) EXPOSICIÓN A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Se trabajó con un equipo Crosslinker BIO-LINK<sup>®</sup> BLX UV, equipado con portalámparas que

permiten intercambiar las fuentes de radiación. Se utilizaron lámparas de radiación UV-A (365 nm), radiación UV-B (312 nm) y radiación UV-C (254 nm). El equipo permite programar la energía entregada en Joules por  $\text{cm}^2$  ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

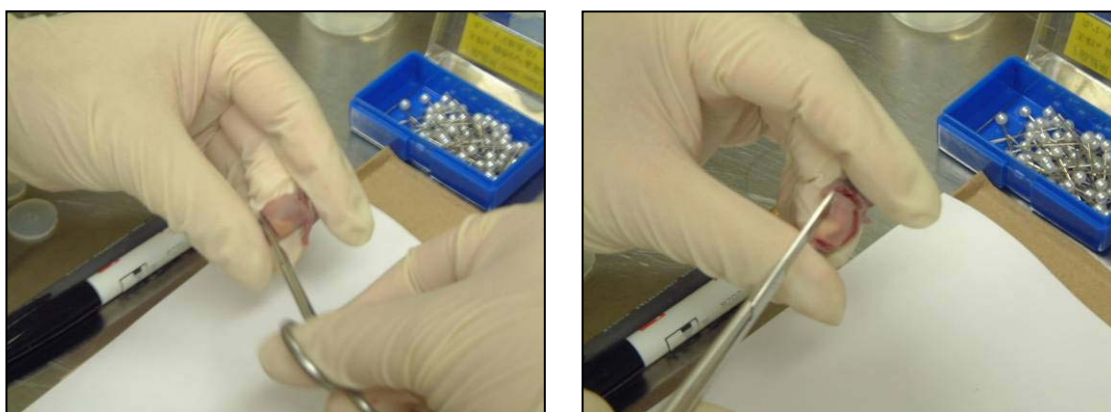
Se irradiaron animales de entre 2 y 4 días de edad. Estos neonatos, carecen de pelaje en la región dorsal. Los ratones fueron sujetos sobre un soporte plástico, orientando su dorso hacia arriba y colocados dentro del equipo a unos 20 cm de las lámparas UV como se observa en la figura 10.



**Figura 10:** Esquema de trabajo para realizar la irradiación de la piel dorsal de los neonatos

Los animales fueron irradiados con diferentes dosis. Basándose en reportes previos realizados con radiación UV-B en piel de ratones (Ahn y col., 1998), se seleccionó una dosis de  $500 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  como moderada. Como dosis bajas se usaron 33, 100 y  $333 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ; mientras que como dosis altas se usaron 1000 y  $2000 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ . Con el propósito de realizar un estudio comparativo, las mismas dosis fueron utilizadas para trabajar con la radiación UV-A y UV-C. Como control, los ratones fueron colocados en el interior del equipo sobre los mismos soportes plásticos durante el mismo tiempo pero sin exponerse a radiación UV alguna.

Luego de la exposición a la radiación ultravioleta, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y la piel de la región dorsal fue inmediatamente removida (Fig. 11) y procesada para los estudios inmunohistoquímicos y de cuantificación génica.



---

**Figura 11:** Obtención de la piel de la región dorsal

### **III.10) REGISTRO DE LAS IMÁGENES**

El registro de las marcas se realizó con el microscopio óptico vertical BX50 de Olympus (Olympus, Japón). El mismo tiene acoplada una cámara monocromática digital CCD refrigerada de 14 bits de resolución (Apogee Co.). El registro de las señales de fluorescencia fue visualizado utilizando el mismo microscopio trabajando en modo epifluorescencia. Para ello cuenta con una lámpara de mercurio que brinda picos de luminancia en las siguientes longitudes de onda 365/366; 404,7; 435; 546,1 y 577/579,1 nm y una torreta que permite colocar diferentes configuraciones de cubos con filtros.

En los diferentes experimentos se trabajó utilizando lentes objetivas de 20X, 40X y 100X. El aumento final, se indica en cada una de las figuras por medio de una barra que representa la escala utilizada.

### **III.11) ESTADÍSTICA EMPLEADA**

Todos los valores presentados en este trabajo se hallan expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Para validar la invariabilidad del gen GAPDH se aplicó un test ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis con un test de comparación múltiple de medianas de Dunn. La linealidad en las reacciones de PCR se evaluó utilizando el método de análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados.

En los estudios de cuantificación de la expresión génica de los diferentes genes del sistema de las endotelinas durante el desarrollo se aplicó un test ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis con



un test de comparación de Dunn para columnas seleccionadas; en el cuál las diferencias menores a 0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

En los experimentos sobre intestino las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando un test no paramétrico de Mann-Whitney; en el cuál las diferencias menores a 0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

En los experimentos sobre piel las comparaciones fueron realizadas sobre un control (muestras no irradiadas o tiempo cero), situación en la que se aplicó un test ANOVA paramétrico con un test de comparación de Dunnett; en el cuál las diferencias menores a 0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas y menores a 0,01 muy significativas.

Todos los datos fueron procesados y analizados utilizando la versión 3.03 del programa estadístico GraphPad InStat® (GraphPad Software, San Diego, California USA). Los gráficos se ejecutaron utilizando el programa SigmaPlot 2001 versión 7.0 (Systat Software Inc. (SSI), Richmond, California, USA).

El número de animales utilizados así como la réplica de los experimentos, serán indicados en cada uno de los respectivos pies de figuras.

## **IV – RESULTADOS**

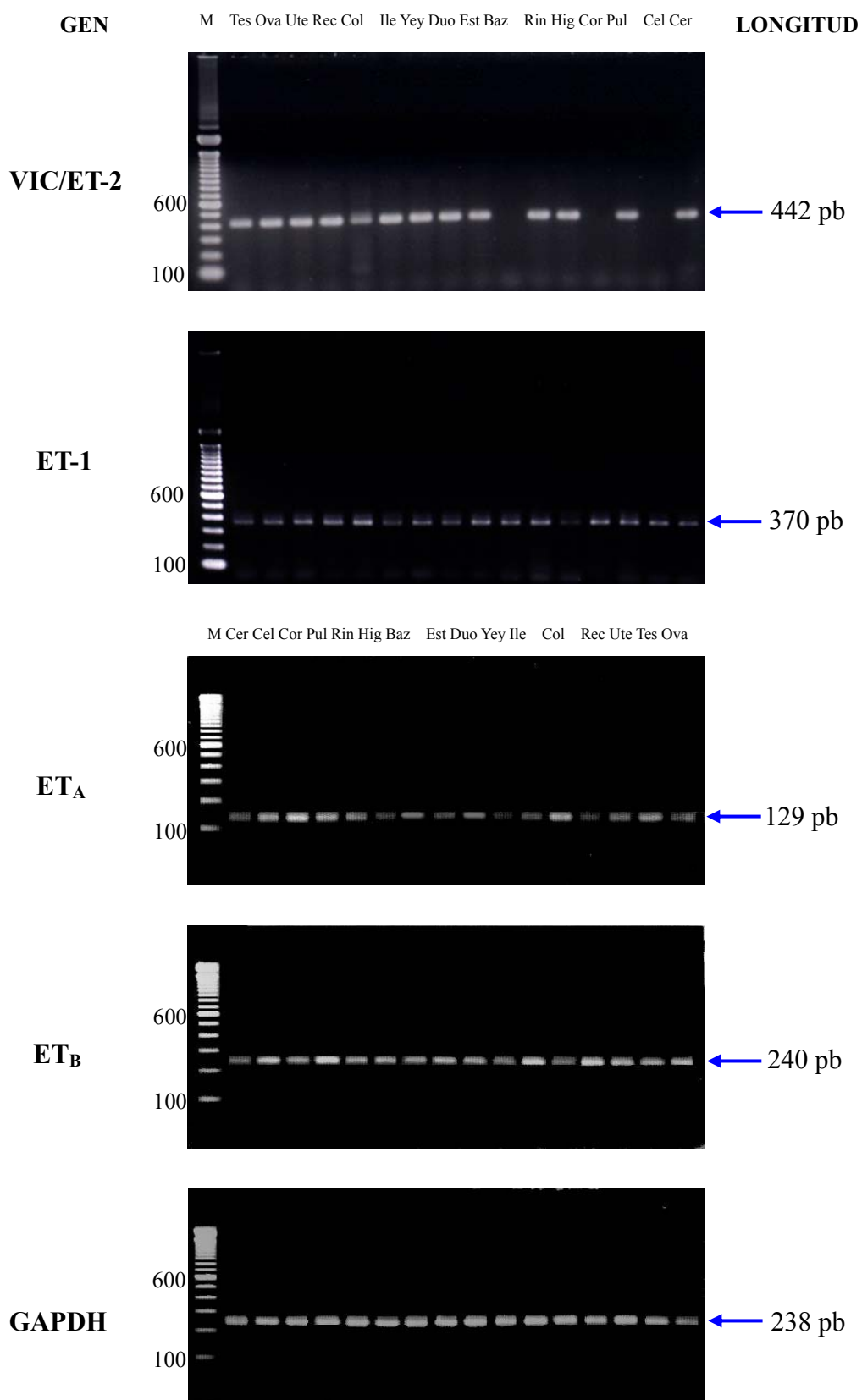
La presentación de los resultados ha sido dividida en tres secciones. La primera resume los datos obtenidos en los diferentes procedimientos utilizados para validar la técnica de PCR en tiempo real y los diferentes métodos de cuantificación aplicados en diferentes órganos de ratones adultos. La segunda sección se centra en el estudio de la expresión génica de los ligandos y receptores de ETs realizada en diferentes órganos y estadios del desarrollo. Finalmente en la tercera se presentan los datos obtenidos en los modelos experimentales realizados sobre intestino y piel.

### **IV.1- VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA**

#### **IV.1-a) Confirmación de la especificidad de los cebadores**

Para documentar la especificidad de los productos de la reacción se realizaron geles de agarosa de alta resolución (Uchide y col., 2001a; Adur y col., 2004). En la figura 12 se pueden observar los geles representativos de 3 experimentos (realizados para los ligandos, los receptores y GAPDH) efectuados después de la cuantificación utilizando el sistema descrito. Se observa que en todos los casos se ha desarrollado una banda simple con la longitud prevista para cada uno de los genes (VIC/ET-2: 442 pb; ET-1: 370 pb; ET<sub>A</sub>: 129 pb; ET<sub>B</sub>: 240 pb y GAPDH: 238 pb).

No se observó una banda específica para el ARNm del gen VIC/ET-2 en cerebelo, corazón y bazo. Los restantes genes presentaron una única banda en todos los órganos evaluados.



**Figura 12:** Fotografías de los diferentes geles. Marcador (M); cerebro (Cer), cerebelo (Cel), corazón (Cor), pulmón (Pul), hígado (Hig), riñón (Rin), bazo (Baz), ovario (Ova), útero (Ute), testículo (Tes), estómago (Est), duodeno (Duo), yeyuno (Yey), íleon (Ile), colon (Col) y recto (Rec).

#### **IV.1- b) Variabilidad de la técnica**

Para evaluar la precisión del ensayo se utilizó el coeficiente de variación porcentual, obtenido como la razón entre el desvío estándar y la media multiplicada por 100. Se calculó tanto un coeficiente de variación intra-ensayo ( $CV_i$ ), determinado amplificando paralelamente muestras de tres órganos diferentes por octuplicado; como un coeficiente de variación entre-ensayos ( $CV_e$ ) el que se determinó amplificando muestras de tres órganos en ocho ensayos independientes, desarrollados durante dos semanas (Young y col., 1986).

En todos los casos las diferencias entre la máxima y la mínima cantidad de producto amplificado cayó en un intervalo de 3 ciclos. Por ejemplo, para muestras de colon la mínima producción se da en 30 ciclos y la máxima a los 33 ciclos. Esta situación se repite en todos los estudios realizados. Por lo tanto, aunque difiera el número de ciclos en todos los casos el 100 % de la producción se da en intervalos de tres ciclos.

El coeficiente de variación intra-ensayo ( $CV_i$ ) para los ligandos (VIC/ET-2, ET-1) correspondió a un  $CV_i$  del ciclo umbral  $C_t$  de la amplificación, que va de 0,45% a 1,70% y para los receptores (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>) correspondió a un  $CV_i$  del ciclo umbral  $C_t$  de la amplificación, que va de 0,70% a 1,70%. Por otro lado, el coeficiente de variación entre-ensayos ( $CV_e$ ) para los ligandos (VIC/ET-2, ET-1) correspondió a un  $CV_e$  del ciclo umbral  $C_t$  de la amplificación, que va de 0,88% a 1,70% y para los receptores (ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub>) correspondió a un  $CV_e$  del ciclo umbral  $C_t$  de la amplificación que va de 0,65% a 1,78%.

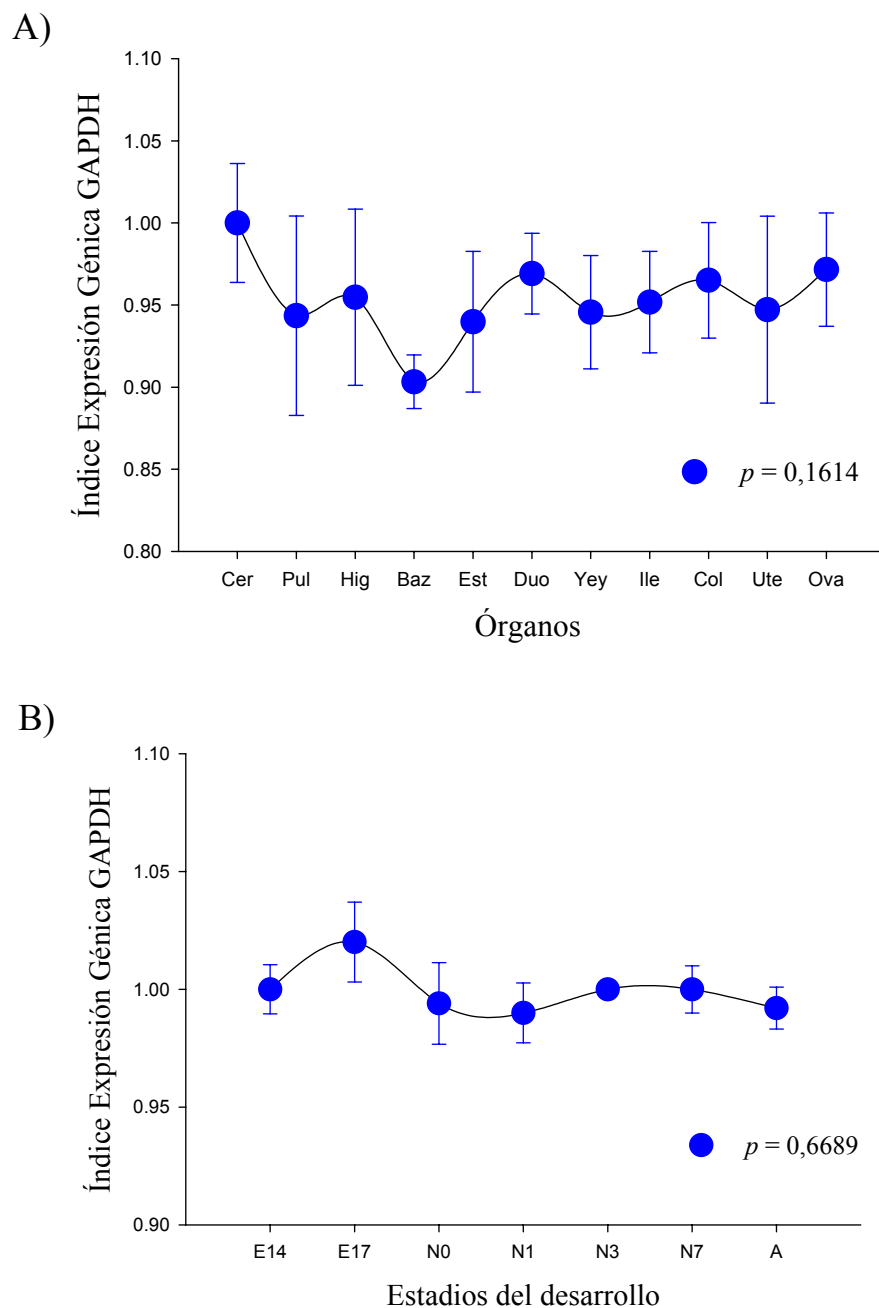
Los resultados precedentes permitieron demostrar que, cambios en la expresión génica levemente superiores a 1,5 ciclos, pueden ser detectados por esta técnica. (Uchide y col., 2001a; Adur y col., 2004).

#### **IV.1-c) Confirmación de la invariabilidad del gen utilizado para la normalización**

Para poder usar los niveles de expresión del gen GAPDH como valor patrón, éste debía mantener un nivel constante de expresión en todos los órganos y durante los diferentes estadios del desarrollo embrionario.

Para esto, se aplicó el método  $2^{-\Delta C_t}$  donde  $\Delta C_t = [C_{t, (GAPDH)} - C_{t, (Calibrador)}]$ . Este procedimiento es una simplificación del método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak, 1997; Schmittgen y Zakrajsek, 2000). En esta variante, el gen utilizado como referencia es el mismo que se utiliza como blanco. En la figura 13A se presenta la cantidad relativa de GAPDH en 11 órganos diferentes, seleccionados al azar

( $n = 4$ ). En la figura 13B, se presentan los resultados obtenidos en útero, de la cantidad relativa de GAPDH durante diferentes estadios del desarrollo ( $n = 3$ ). Resultados similares fueron encontrados en pulmón trabajando en diferentes estadios del desarrollo (Adur y col., 2003).

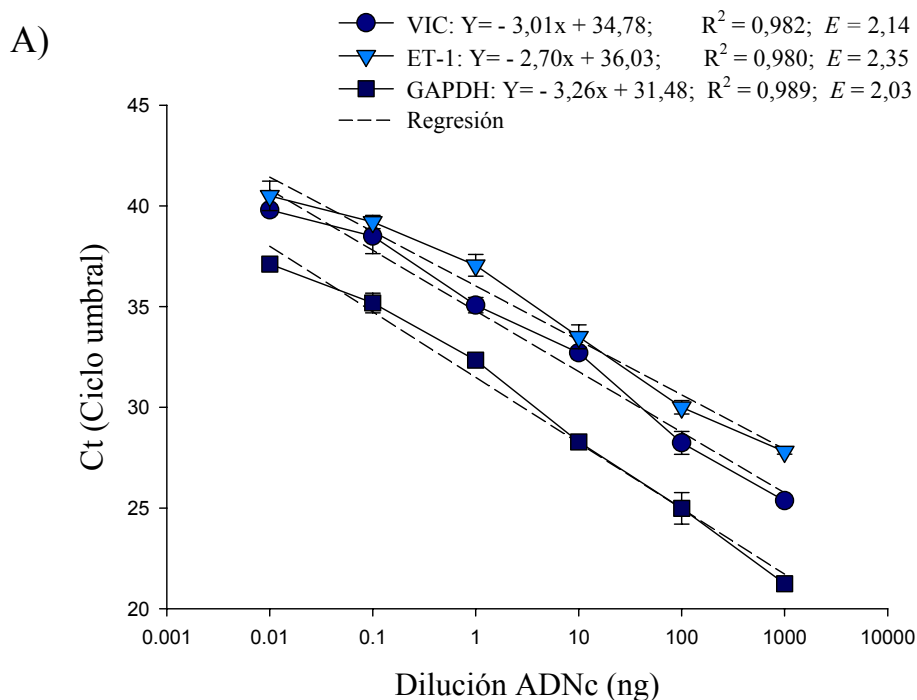


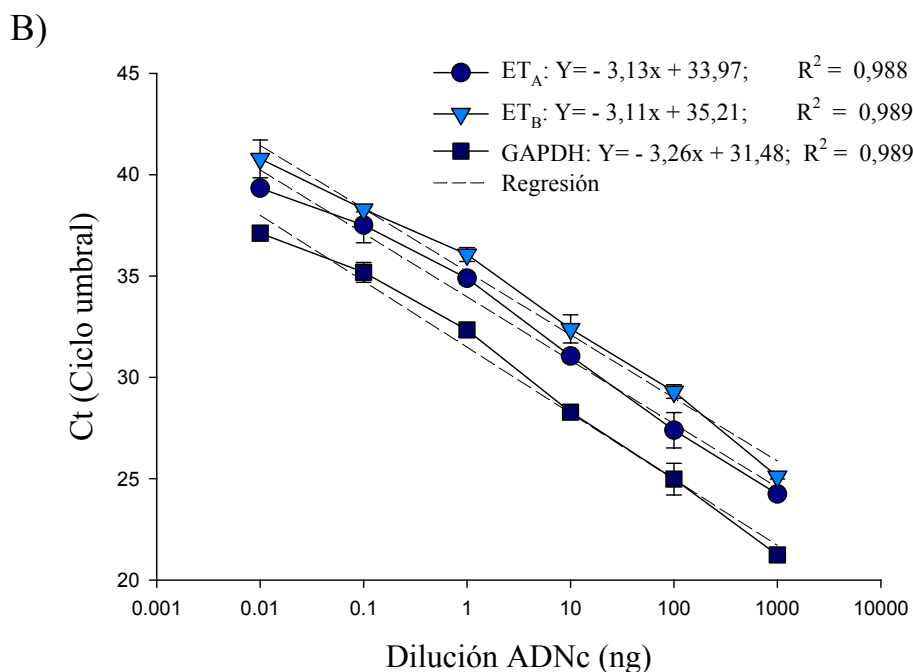
**Figura 13:** Aplicación del método  $2^{-\Delta Ct}$  para analizar las variaciones del gen utilizado como referencia. Para cada órgano o estadio del desarrollo, se obtuvo el ARN y se convirtió en ADNc, el cuál fue amplificado por PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos para GAPDH. A) Comprobación de la invariabilidad de GAPDH ( $p < 0,1614$ ) en 11 órganos diferentes. La expresión en cerebro fue utilizada como calibrador. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 4$ ). B) Comprobación de la invariabilidad de GAPDH ( $p < 0,6689$ ) para diferentes estadios del desarrollo. La expresión para E14 fue utilizada como calibrador. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 3$ ). El valor  $p$  se calculó usando un test ANOVA no paramétrico de *Kruskal-Wallis* con un *test* de comparación múltiple de medianas de *Dunn*.

Los datos son presentados como el valor medio  $\pm$  el desvío estándar ( $m \pm ds$ ) y el valor  $p$  de significatividad se calculó usando un *test* ANOVA no paramétrico de *Kruskal-Wallis* con un *test* de comparación múltiple de *Dunn*. En ambos casos las diferencias fueron no significativas:  $p = 0,1614$  en el estudio para los diferentes órganos y  $p = 0,6689$  en el estudio del desarrollo.

#### IV.1-d) Eficiencia y linealidad de la amplificación

Para evaluar la eficiencia y la linealidad de la amplificación, fueron utilizadas diluciones seriadas de ADNc de pulmón (órgano en el que como se ha indicado previamente, se expresa todo el sistema de las ETs; Adur y col., 2003). El ADNc fue amplificado por PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos para los ligandos se observan en la figura 14A y los obtenidos para los receptores en la figura 14B. En ambas gráficas puede observarse también el comportamiento del gen GAPDH, utilizado para la normalización. Los diferentes genes analizados, mostraron una alta linealidad en el rango evaluado ( $R^2 > 0,97$ ) (Fig. 14). Adicionalmente se evaluó, la eficiencia ( $E$ ) de la reacción en un ciclo de la fase exponencial, aplicando la ecuación  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ . Para todos los genes evaluados, la tasa de eficiencia de la reacción fue alta y exhibió un alto grado de similitud en el rango del ADNc analizado (Fig. 14A: VIC/ET-2: 2,14; ET-1: 2,35; GAPDH: 2,03 y Fig.14B: ET<sub>A</sub>: 2,08; ET<sub>B</sub>: 2,09; GAPDH: 2,03).



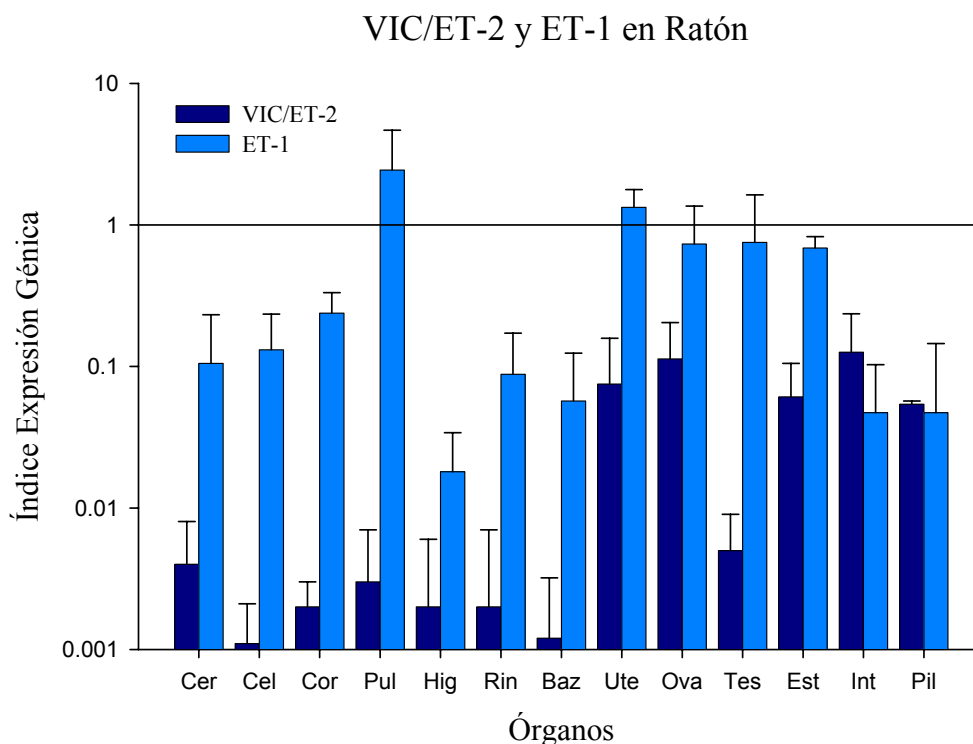


**Figura 14:** Determinación de la eficiencia y linealidad de la PCR en tiempo real utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . En ordenadas se representa el ciclo umbral y en abscisas diferentes diluciones de ADNc provenientes de pulmón. A) Amplificación para los ligandos VIC/ET-2 y ET-1 en un rango de 0,01 - 1000 ng de ADNc. B) Amplificación para los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en un rango de 0,01 - 1000 ng de ADNc. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 3$ ) y la eficiencia se determinó como  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ . La linealidad de las reacciones se determinó utilizando el análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados.

## IV.2 - ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ENDOTELINAS

### IV.2-a) Expresión de VIC/ET-2 y ET-1 en animales adultos

Validada la técnica con los diferentes experimentos presentados en la sección IV.1, se realizó una cuantificación absoluta para determinar la expresión de los genes VIC/ET-2 y ET-1 en 13 órganos de ratones adultos. Como se observa en la figura 15, la expresión génica de la ET-1 se manifestó en todos los órganos. En pulmón, útero, ovario, testículos y estómago se observó un índice de expresión génica elevado ( $> 0,5$ ). Por otro lado, salvo en intestino, en los demás órganos analizados el índice de expresión génica del gen VIC/ET-2 fue menor comparado con el determinado para ET-1. El VIC/ET-2 fue expresado principalmente en útero, ovario, estómago, intestino y piel. Bajos niveles de expresión para VIC/ET-2 fueron detectados en órganos como cerebelo, corazón, riñón, bazo e hígado.

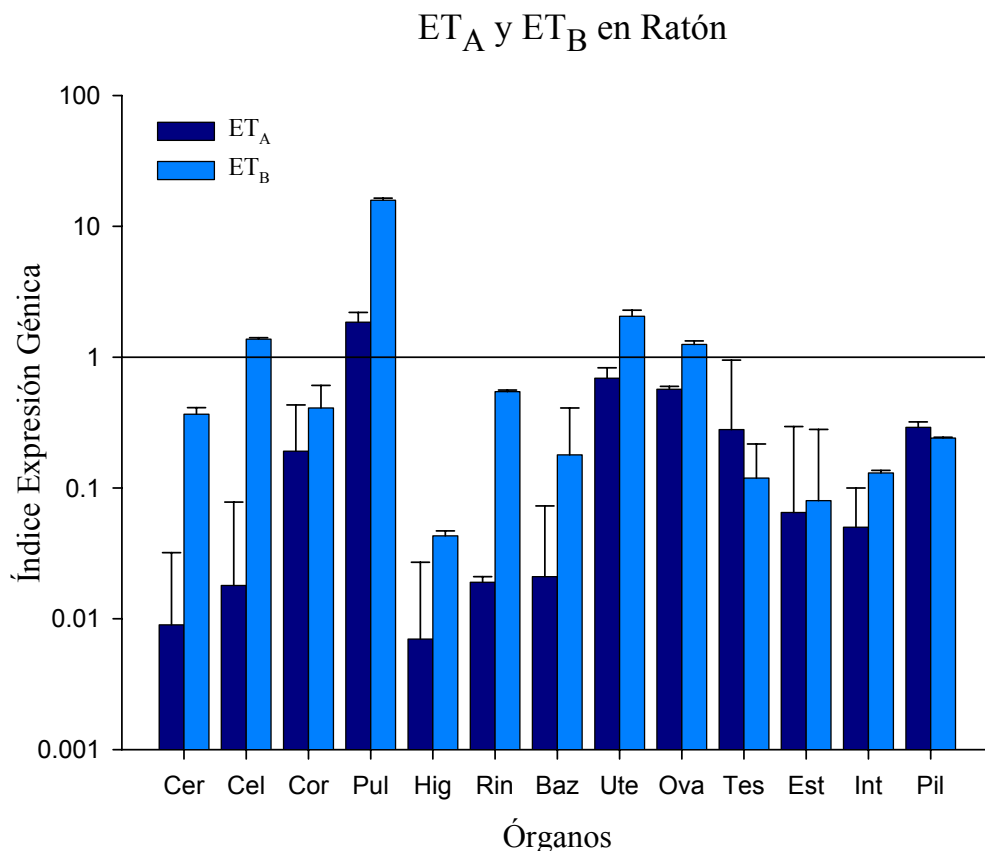


**Figura 15:** Niveles de expresión génica de VIC/ET-2 y ET-1 en cerebro (Cer), cerebelo (Cel), corazón (Cor), pulmón (Pul), hígado (Hig), riñón (Rin), bazo (Baz), útero (Ute), ovario (Ova), testículo (Tes), estómago (Est), intestino (Int) y piel (Pil); utilizando PCR en tiempo real y cuantificación absoluta. Los índices de expresión génica fueron calculados normalizándolos con el gen GAPDH. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 4$ ).

#### IV.2-b) Expresión de ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en animales adultos

Utilizando el mismo procedimiento que para los ligandos, se realizó una cuantificación absoluta de los transcritos de los genes ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en 13 órganos de ratones adultos. Como se observa en la figura 16, la expresión génica de ambos receptores se manifestó en todos los órganos. El índice de expresión génica para ET<sub>A</sub> fue elevado ( $> 0,5$ ) en pulmón, útero y ovario, mientras que en corazón, estómago y testículos fue moderado (entre 0,1 y 0,5). En los demás órganos el índice de expresión génica de ET<sub>A</sub> fue bajo ( $< 0,1$ ). ET<sub>B</sub> presentó un elevado índice de expresión ( $> 0,5$ ) en cerebelo, pulmón, útero y ovario y un índice moderado (entre 0,1 y 0,5) en cerebro, corazón, hígado, bazo, intestino y testículos. En los demás órganos el índice de expresión de ET<sub>B</sub> fue bajo ( $< 0,1$ ). La expresión de ET<sub>B</sub> fue mayor que la de ET<sub>A</sub> en todos los órganos examinados, excepto en testículo y piel.





**Figura 16:** Niveles de expresión génica de ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en cerebro (Cer), cerebelo (Cel), corazón (Cor), pulmón (Pul), hígado (Hig), riñón (Rin), bazo (Baz), útero (Ute), ovario (Ova), testículo (Tes), estómago (Est), intestino (Int) y piel (Pil); utilizando PCR en tiempo real y cuantificación absoluta. Los índices de expresión génica fueron calculados normalizándolos con el gen GAPDH. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 4$ ).

#### IV.2-c) Expresión de VIC/ET-2 y ET-1 en embriones

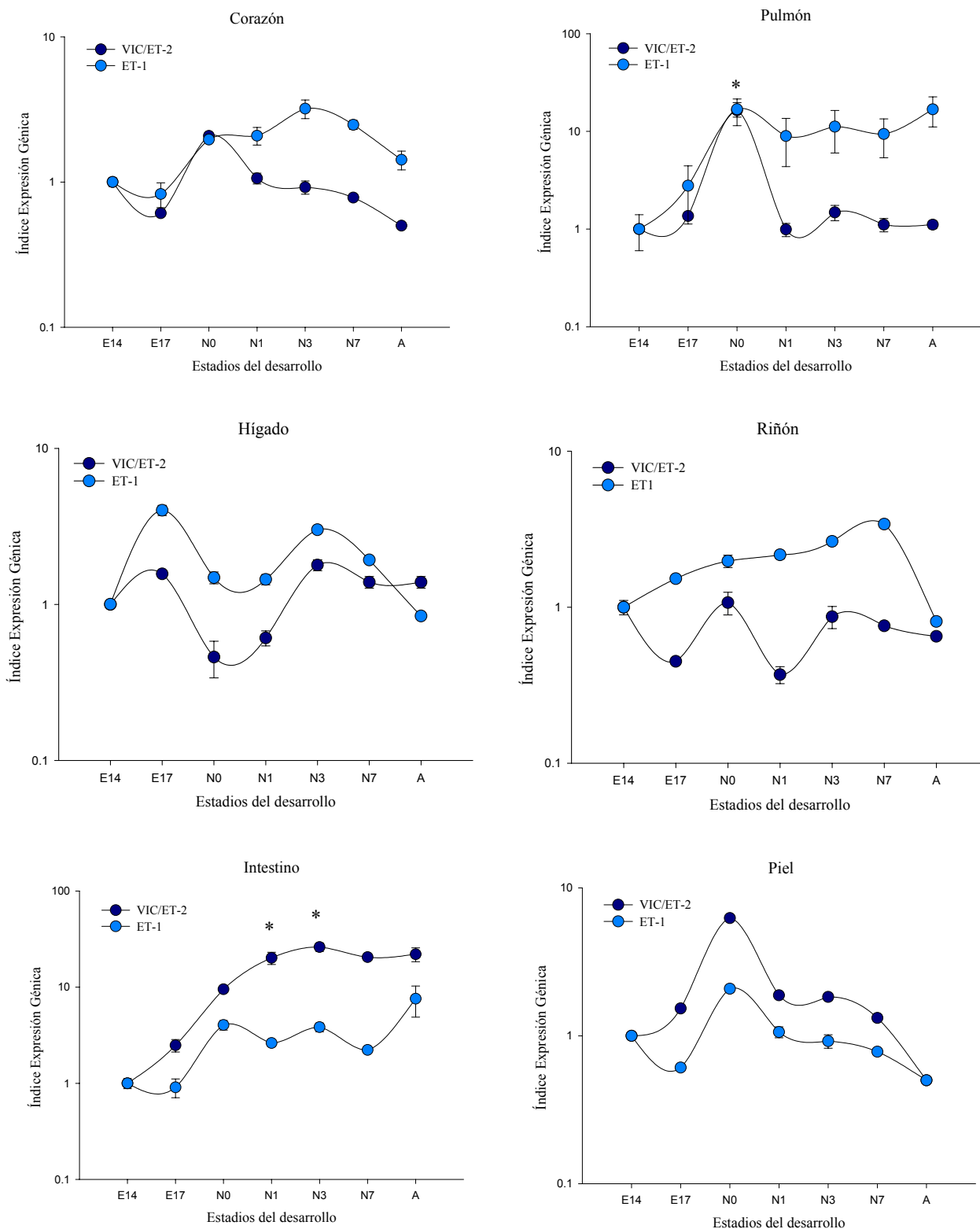
Analizado el sistema ETs en órganos de animales adultos, se procedió a realizar los estudios durante diferentes estadios del desarrollo. Para estos estudios, se realizó una cuantificación relativa. La figura 17 presenta los índices de expresión génica relativos de los genes VIC/ET-2 y ET-1 en órganos murinos embrionarios (E), de neonatos (N) y de animales adultos (A). Los cálculos se realizaron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ; utilizando como calibrador los valores de la expresión génica del embrión a los 14 días (E14). Se seleccionaron órganos de fácil extracción y que se sabe expresarán el sistema de las ETs.

Los índices de expresión de ET-1 permanecen prácticamente constantes (razón de cambio  $< 5$ ) respecto a E14 durante el desarrollo en: corazón, hígado, riñón, intestino y piel. En pulmón, el índice de expresión de ET-1 presentó un incremento (razón de cambio  $> 15$ ) en N0 (momento del

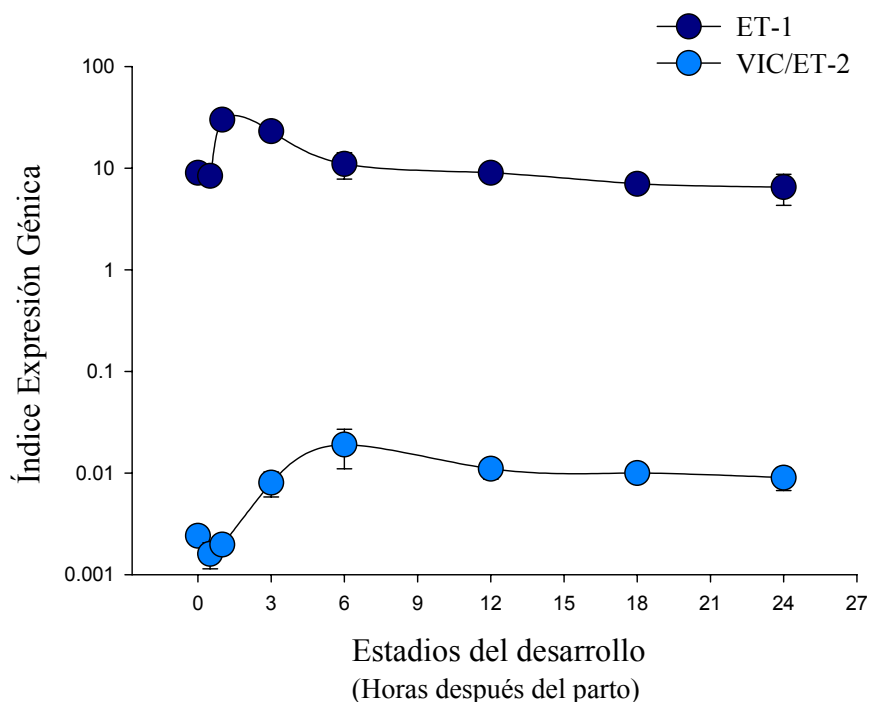
alumbramiento), manteniendo esos valores durante el resto de los estadios estudiados. Por su parte, los índices de expresión de VIC/ET-2 permanecen prácticamente constantes (razón de cambio  $< 5$ ) respecto a E14 durante el desarrollo en corazón, hígado y riñón. En pulmón, el índice de expresión de VIC/ET-2 exhibió un pico (razón de cambio  $> 15$ ) en N0 (momento del alumbramiento) alcanzando valores similares a ET-1, pero a diferencia de éste, luego del parto el índice retornó a niveles similares a los presentados durante los estadios embrionarios (E14, E17). En la piel se observa un comportamiento similar al descrito para pulmón, salvo que el pico en N0 presenta una razón de cambio cercana a 10. En intestino se observa un marcado incremento durante los estadios embrionarios (razón de cambio  $> 10$ ), llegando a un pico en N0 y N1 (razón de cambio  $> 15$ ), manteniéndose en esos valores durante el resto del desarrollo. En este órgano, los niveles de expresión de VIC/ET-2 en estos estadios resultó ser dos a tres órdenes de magnitud superior con respecto a los otros órganos.

La cuantificación absoluta para determinar la expresión génica de ET-1 y VIC/ET-2 mostró un comportamiento similar a los aquí presentados (Uchida y col., 2002).

Dada la similitud del comportamiento que exhiben los genes VIC/ET-2 y ET-1 en el pulmón al momento del alumbramiento, se decidió hacer un análisis más exhaustivo, focalizándose en las 24 horas siguientes al nacimiento. La cuantificación se realizó en forma absoluta y los resultados se presentan en la figura 18. La expresión de ambos genes durante el período examinado mostró un patrón similar; un marcado incremento inicial seguido de una disminución gradual dentro de unas pocas horas después del nacimiento. Los niveles de expresión de ET-1 son muy superiores (más de 100 veces) que los niveles encontrados para VIC/ET-2.



**Figura 17:** Niveles de expresión génica de VIC/ET-2 y ET-1 durante el desarrollo. La cuantificación relativa se realizó con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Los órganos fueron extraídos de embriones de 14 y 17 días de gestación (E14, E17), de neonatos a días 0, 1, 3 y 7 después del alumbramiento (N0, N1, N3, N7) y de animales adultos (A). E14 fue seleccionado para calibrar los niveles de expresión. Para los otros estadios, los índices representan la razón de cambio respecto a E14. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 3$ ). El asterisco (\*) representa una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre N0, N1 o N3 y E14;  $p$  se calculó usando un test ANOVA no paramétrico de *Kruskal-Wallis* con un test de comparación de *Dunn* para columnas seleccionadas.



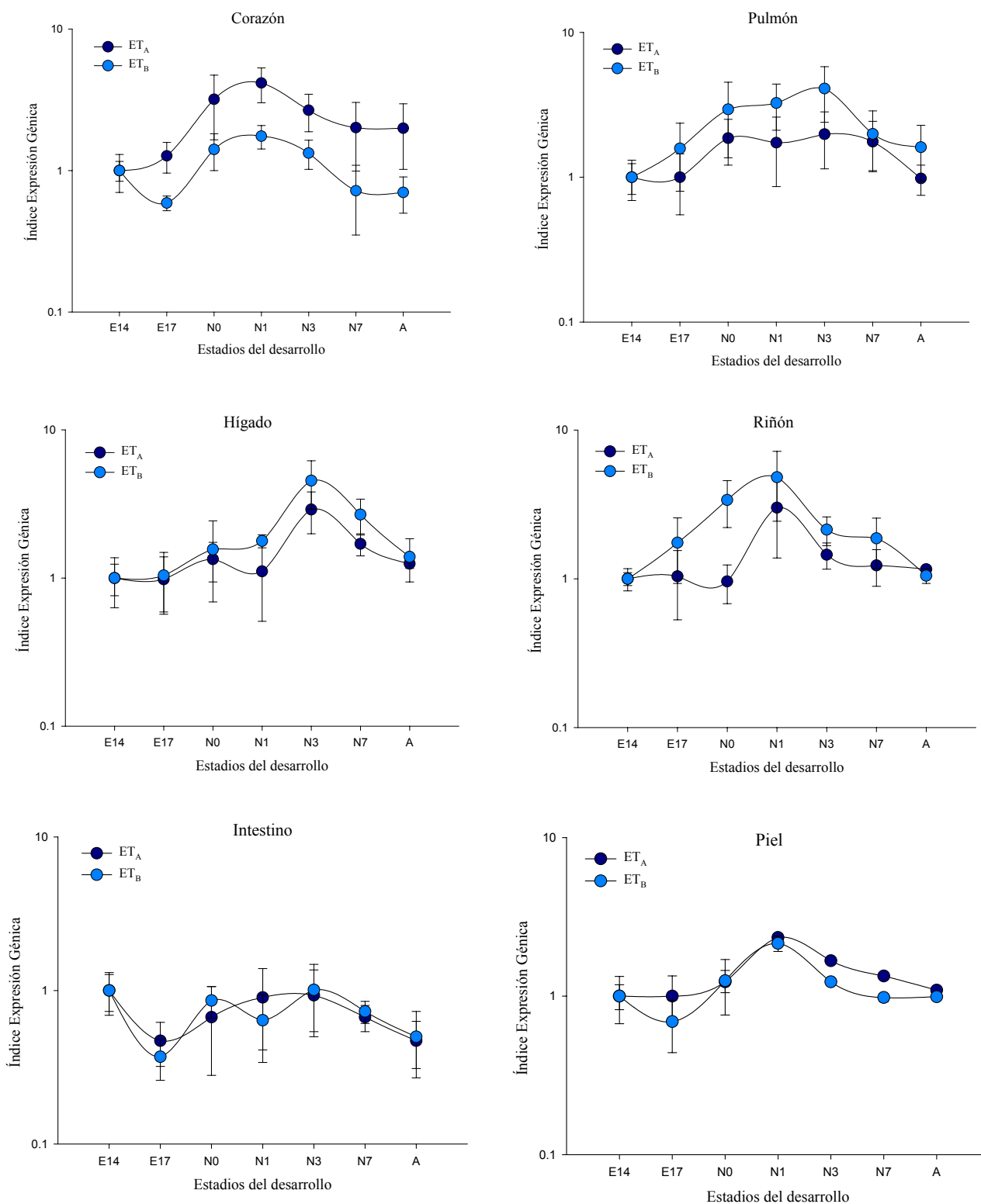
**Figura 18:** Niveles de expresión génica de ET-1 y VIC/ET-2 en pulmón durante un periodo de 24 hs luego del nacimiento. La cuantificación absoluta se determinó por PCR en tiempo real. El órgano fue removido a hora 0 (inmediatamente luego de nacer) y a las 0,5, 1, 3, 6, 12, 18 y 24 horas después del nacimiento. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 3$ ).

#### IV.2-d) Expresión de ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en embriones

En la figura 19 se presentan los datos relativos de la expresión génica de los genes ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en órganos de ratones provenientes de embriones (E), neonatos (N) y animales adultos (A). Al igual que en la figura 17, los cálculos se realizaron utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ; utilizando como calibrador la expresión génica del embrión a los 14 días (E14).

En intestino, los niveles de expresión de ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> permanecen prácticamente constantes (razón de cambio  $< 2$ ) respecto a E14. En el resto de los órganos examinados los niveles de expresión de ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> mostraron un patrón bien definido y similar. Excepto en corazón, el resto de los órganos presentaron una mayor expresión de ET<sub>B</sub> que de ET<sub>A</sub>. La expresión de los receptores mostró un progresivo incremento entre los estadios E14 y N1 en corazón, riñón y piel; y entre E14 y N3 en pulmón e hígado. Luego de alcanzar su máximo, los patrones de expresión se mantienen constantes o decrecen muy poco hasta alcanzar el nivel de expresión en adultos.

Utilizando el mismo método de cuantificación para ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>, se hallaron resultados similares en estos y otros órganos (Adur y col., 2003).



**Figura 19:** Niveles de expresión génica de ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> durante el desarrollo. La cuantificación relativa se realizó con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Los órganos fueron extraídos de embriones de 14 y 17 días de gestación (E14, E17), de neonatos en los días 0, 1, 3 y 7 después del alumbramiento (N0, N1, N3, N7) y de animales adultos (A). El estadio E14 fue seleccionado para calibrar los niveles de expresión. Para los otros estadios, los índices representan la razón de cambio respecto a E14. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 3$ ).

### **IV.3- ANÁLISIS DE LAS ETs EN INTESTINO Y PIEL**

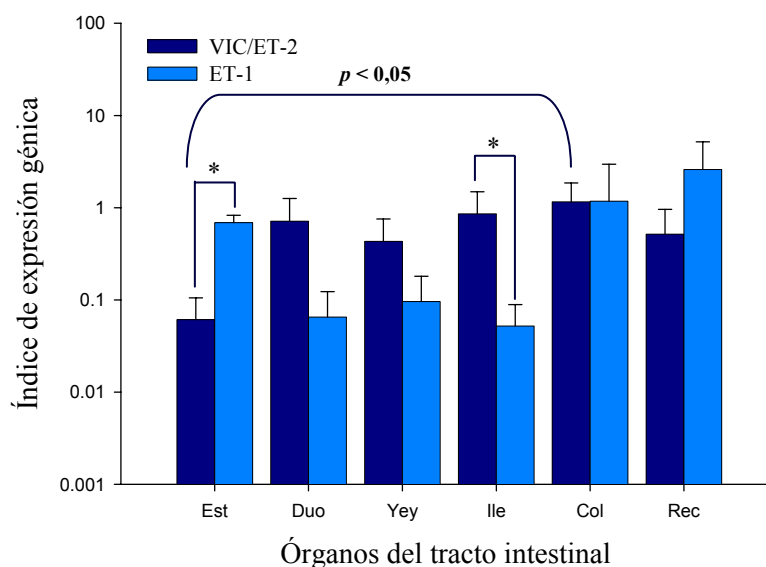
Del análisis pormenorizado de las diferentes experiencias realizadas en el punto IV.2, se observó que el índice de expresión del gen VIC/ET-2 alcanzó niveles importantes en piel, en los sistemas reproductivo, digestivo y respiratorio. Por tal motivo y con la finalidad de comprender con más precisión los roles fisiológicos del VIC/ET-2 en algunos órganos específicos de estos sistemas, en la siguiente sección se presentan los resultados de los diferentes experimentos conducidos sobre intestino y piel.

#### **IV.3-a) Análisis de las ETs en intestino**

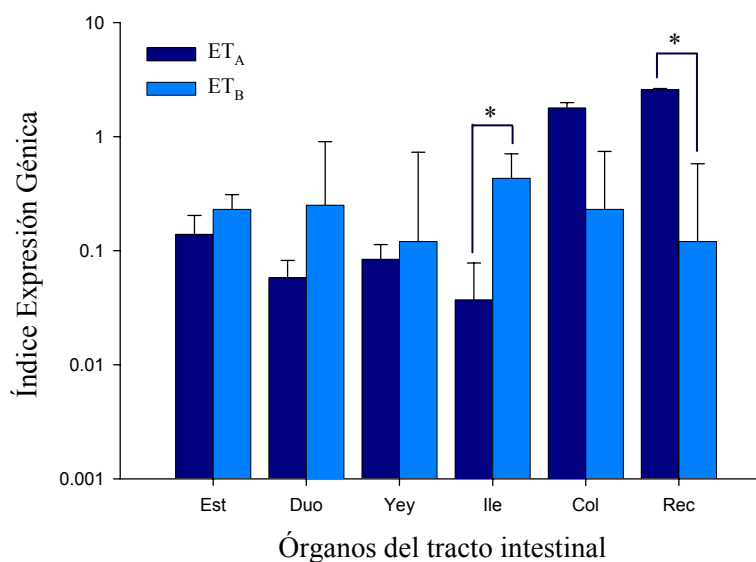
##### **IV.3-a.1) Expresión génica de ligandos y receptores en el tracto intestinal**

En las figuras 20 y 21 se presentan las cuantificaciones absolutas obtenidas en los diferentes segmentos del tracto intestinal para los péptidos (VIC/ET-2 y ET-1) y los receptores (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>) respectivamente. Cuando se comparan las expresiones de ambos péptidos en el mismo segmento se observa que el índice de expresión génica de ET-1 en el estómago resulta significativamente mayor que el de VIC/ET-2, mientras que el índice de VIC/ET-2 fue significativamente superior al de ET-1 en íleon ( $p < 0,05$ ). Cuando se compara la expresión de VIC/ET-2 entre los distintos segmentos del tracto digestivo, sólo se observan diferencias estadísticamente significativas en el índice de expresión entre colon y estómago.

Respecto de los receptores, el índice de expresión de ET<sub>A</sub> fue mayor que el de ET<sub>B</sub> en colon y recto, pero sólo en este último estos porcentajes son estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ). La situación inversa (ET<sub>B</sub> > ET<sub>A</sub>) se dio en el resto de los órganos analizados, pero se verificaron diferencias estadísticamente significativas en íleon ( $p < 0,05$ ).



**Figura 20:** Niveles de expresión génica de VIC/ET-2 y ET-1 en estómago (Est), duodeno (Duo), yeyuno (Yey), íleon (Ile), colon (Col) y recto (Rec); utilizando PCR en tiempo real y cuantificación absoluta. Los índices de expresión génica fueron calculados normalizándolos con el gen GAPDH. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 4$ ). El asterisco (\*) representa diferencias consideradas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). El valor  $p$  se calculó utilizando un test no paramétrico de *Mann-Whitney*.



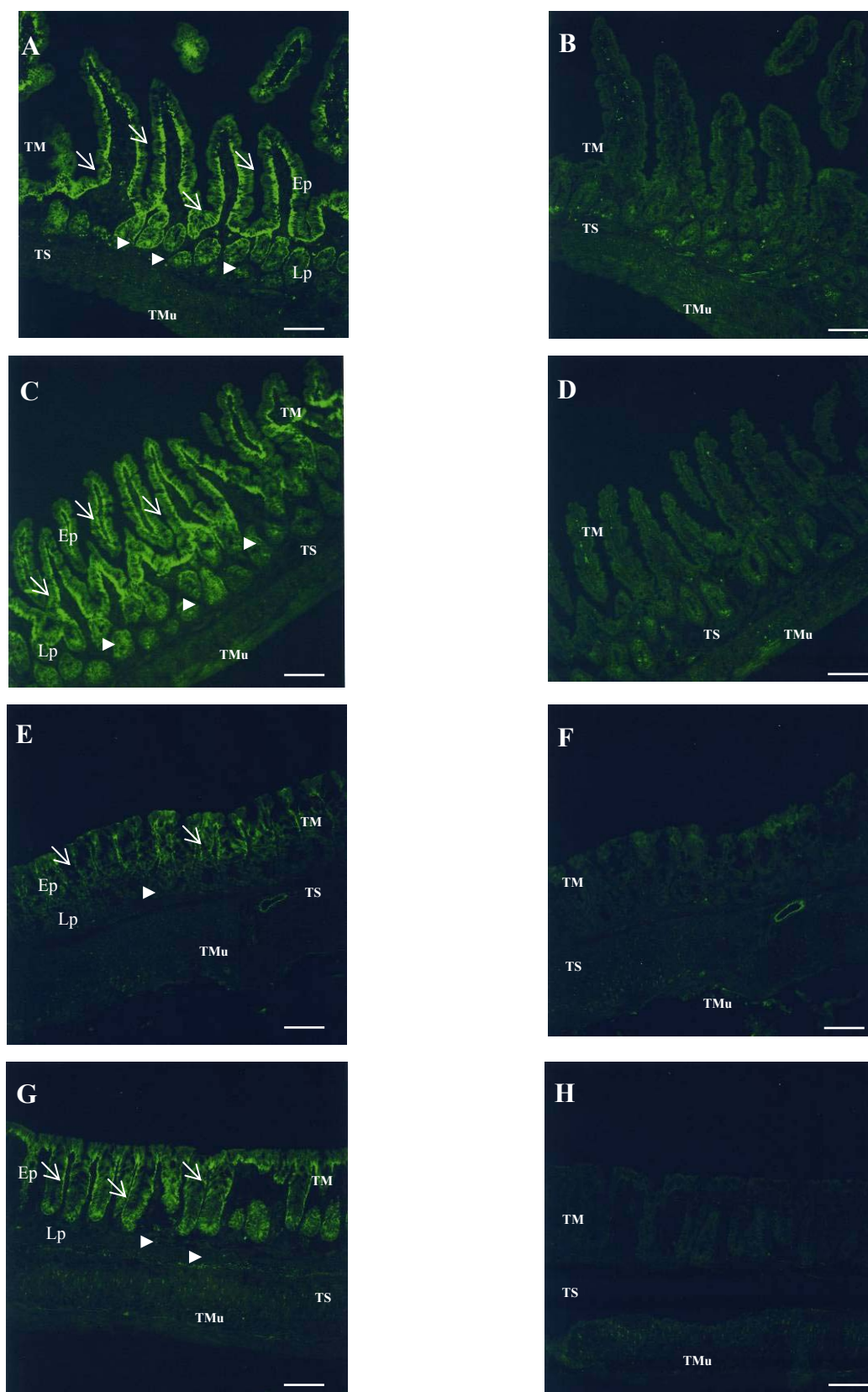
**Figura 21:** Niveles de expresión génica de ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en estómago (Est), duodeno (Duo), yeyuno (Yey), íleon (Ile), colon (Col) y recto (Rec); utilizando PCR en tiempo real y cuantificación absoluta. Los índices de expresión génica fueron calculados normalizándolos con el gen GAPDH. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 4$ ). El asterisco (\*) representa diferencias consideradas estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). El valor  $p$  se calculó utilizando un test no paramétrico de *Mann-Whitney*.

### **IV.3-a.2) Distribución celular de VIC/ET-2 y receptores (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>) en el tracto intestinal**

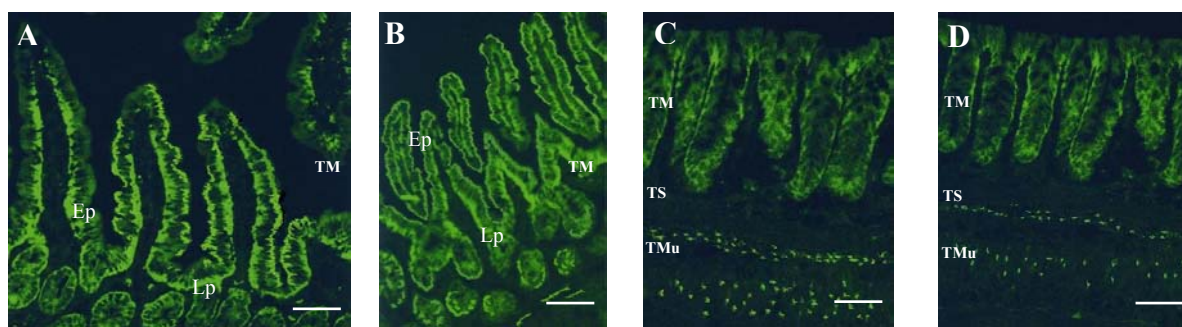
En las diferentes regiones estudiadas (Fig. 22), yeyuno (22A), íleon (22C), colon (22E) y recto (22G); la señal de inmunofluorescencia para VIC/ET-2 se encontró principalmente en la túnica mucosa. Dentro de ésta, la localización preponderante corresponde a las células epiteliales (ver flechas). En esta misma región, la señal fue débil en la lámina propia (ver cabeza de flecha) e inexistente en la muscular de la mucosa. También resultaron negativas la submucosa y las capas musculares. En los diferentes controles, realizados preabsorbiendo el anticuerpo primario con el antígeno correspondiente, prácticamente no se detectó señal (22B-22G).

La inmunofluorescencia para los receptores, mostró que ET<sub>A</sub> está amplia y uniformemente distribuido, tanto en la túnica mucosa como en la muscular (Fig. 23). Sin embargo, el receptor ET<sub>B</sub> es el que exhibe las particularidades más remarcables. Su presencia fue observada en diferentes tipos celulares (Fig. 24). En íleon, la señal fue localizada principalmente en la túnica mucosa (24A). En dicha capa, resultaron positivas para ET<sub>B</sub> las vellosidades intestinales del epitelio, las glándulas tubulares o criptas y las células del estroma de la lámina propia. En particular, ET<sub>B</sub> se observa localizado claramente en una disposición yuxtannuclear en las vellosidades intestinales del epitelio (24C, ver flecha). En la túnica muscular, ET<sub>B</sub> fue encontrado en células, de la capa muscular circular y en las células del plexo mientérico (24D, ver flecha). En el recto, el patrón de inmunofluorescencia fue similar al encontrado en el íleon (24B).

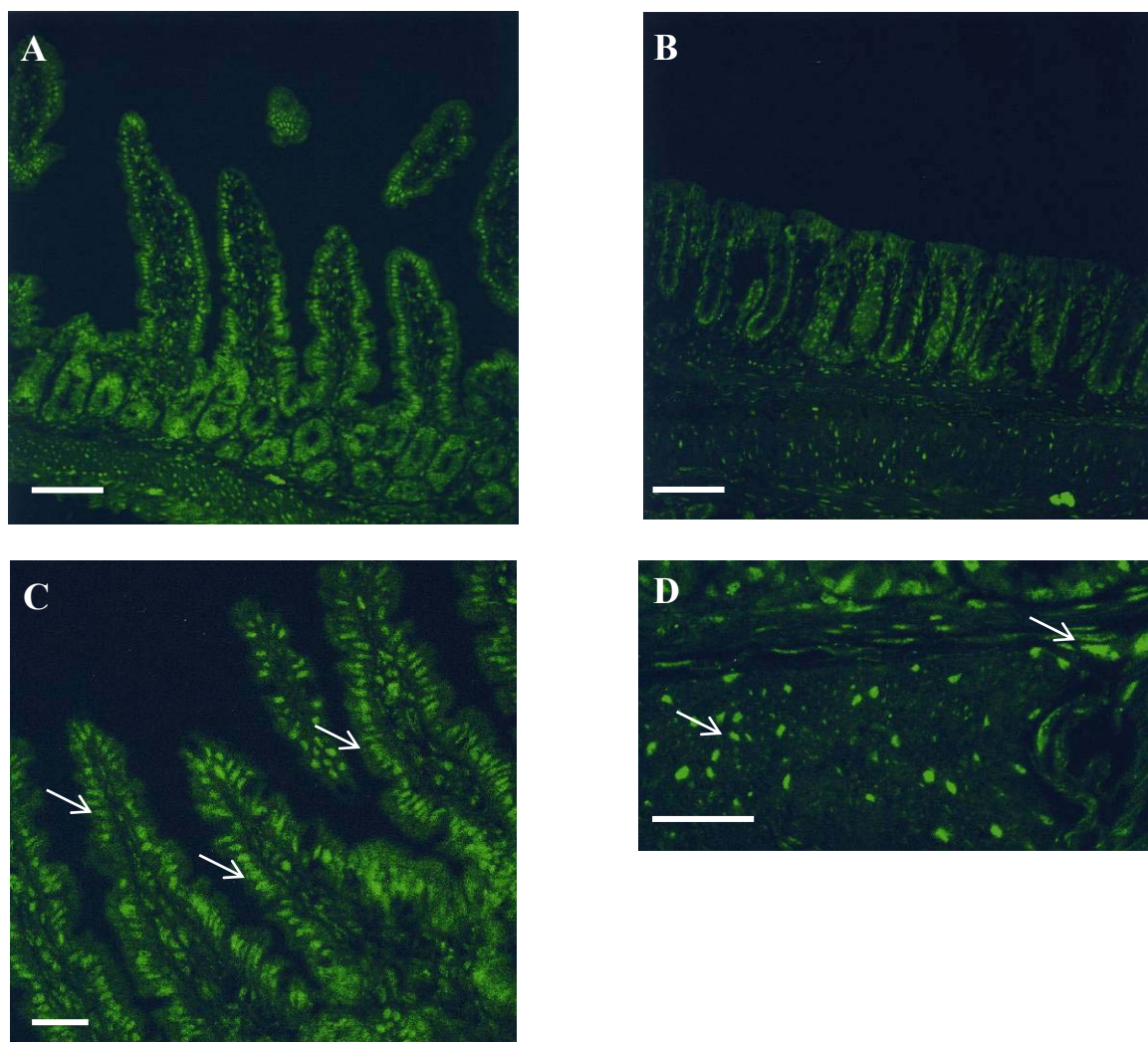




**Figura 22:** Detección por inmunofluorescencia del péptido VIC/ET-2 en el tracto intestinal. A, C: yeyuno, B, D: íleon, E, F: colon y G, H: Recto. Controles (C, D, F, H). Señal positiva en las células epiteliales de la mucosa y más débil en la lámina propia. TM: túnica mucosa, TS: túnica submucosa, TMu: túnica muscular. Ep: epitelio, Lp: lámina propia. Barra = 100  $\mu$ m.



**Figura 23:** Detección por inmunofluorescencia del receptor  $ET_A$  en el tracto intestinal. A: yeyuno, B: íleon, C: colon y D: Recto. Señal positiva en las células epiteliales de la mucosa y en la túnica muscular. TM: túnica mucosa, TS: túnica submucosa, TMu: túnica muscular. Ep: epitelio, Lp: lámina propia. Barra = 100  $\mu$ m.



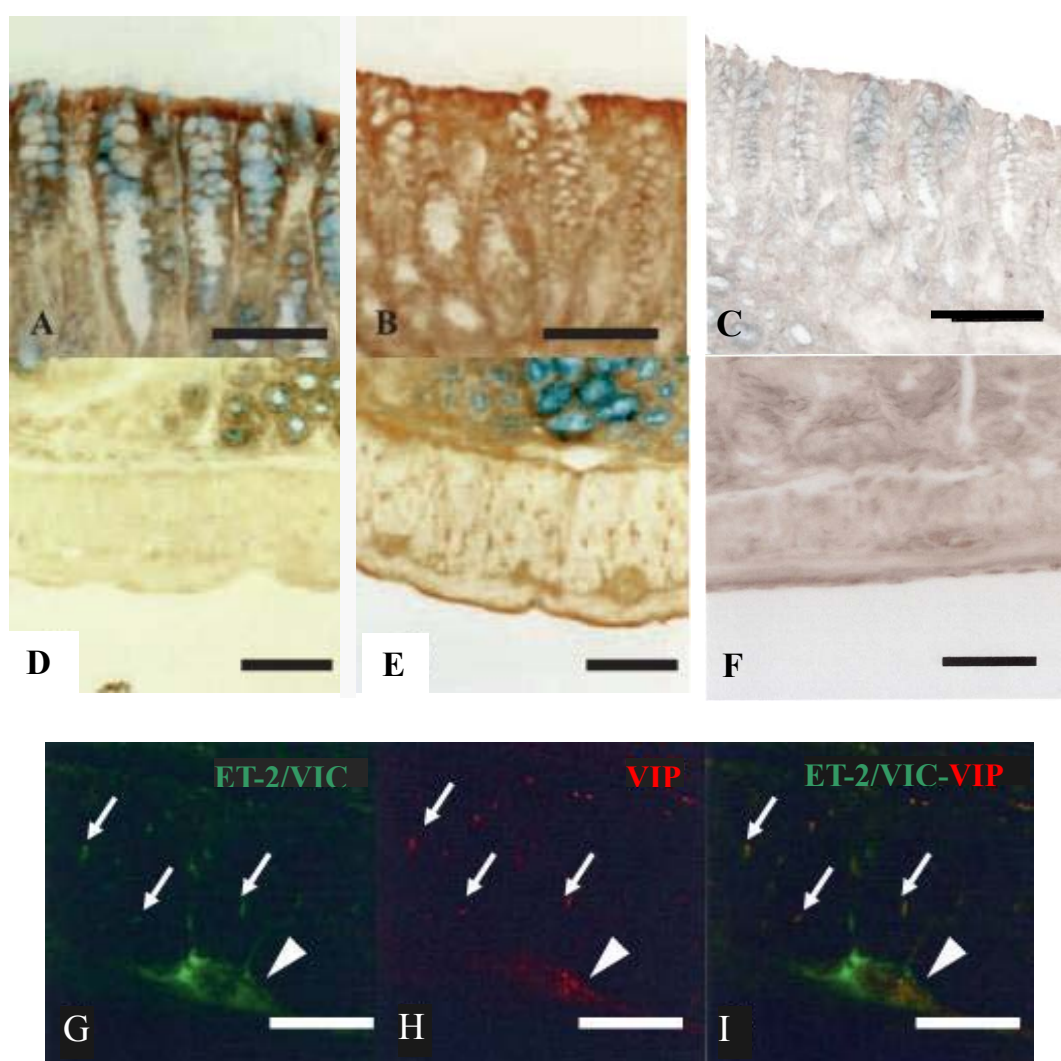
**Figura 24:** Detección por inmunofluorescencia del receptor  $ET_B$  en el tracto intestinal. Secciones longitudinales de íleon (A, C, D) y de recto (B). En las vellosidades del íleon, la inmunomarcación se localizó principalmente en el núcleo (C, ver flechas) de las células epiteliales. En la túnica muscular, la inmunomarcación fue observada en el plexo mientérico (D, ver flechas). Los núcleos de las células epiteliales en el recto fueron también positivos para  $ET_B$  (B). Barra = 50  $\mu$ m en (A-C) y 25  $\mu$ m en (D).

### IV.3-a.3) Distribución celular de VIC/ET-2

Para clarificar los tipos celulares involucrados en la síntesis de VIC/ET-2 –y establecer la comparación con la distribución de ET-1– en las distintas regiones del tracto digestivo, se realizó un estudio pormenorizado combinando técnicas de inmunocitoquímica, inmunofluorescencia e hibridación *in situ*. Los segmentos seleccionados para los estudios comparativos fueron colon (25A y D), íleon (26A, B y C), placas de Peyer (26D y E) y duodeno (26F y G). Como se mencionó precedentemente, en el tracto intestinal la mayor intensidad de inmunomarcación para VIC/ET-2 fue localizada en la túnica mucosa, observándose principalmente en las células epiteliales (25A, 26A y 26F). En la mayoría de estas células se detectó una marca intracelular para VIC/ET-2 a lo largo de todo el tracto intestinal (colon: 25A, íleon: 26A, placas de Peyer: 26D y duodeno: 26F), concentrándose en las vecindades de la membrana basal. Sin embargo, la inmunomarcación fue muy débil en la lámina propia (26A y F). La señal observada en la submucosa y en las tunicas musculares fue débil comparada con la observada en túnica mucosa (25D, 26B y 26F). En contraste, la inmunomarcación para ET-1 en colon se encontró distribuida uniformemente en las células epiteliales, observándose la mayor concentración sobre las células dispuestas más superficialmente (25B). Además, en la túnica muscular se observa señal para ET-1 en las neurofibras y en el plexo mientérico (25E).

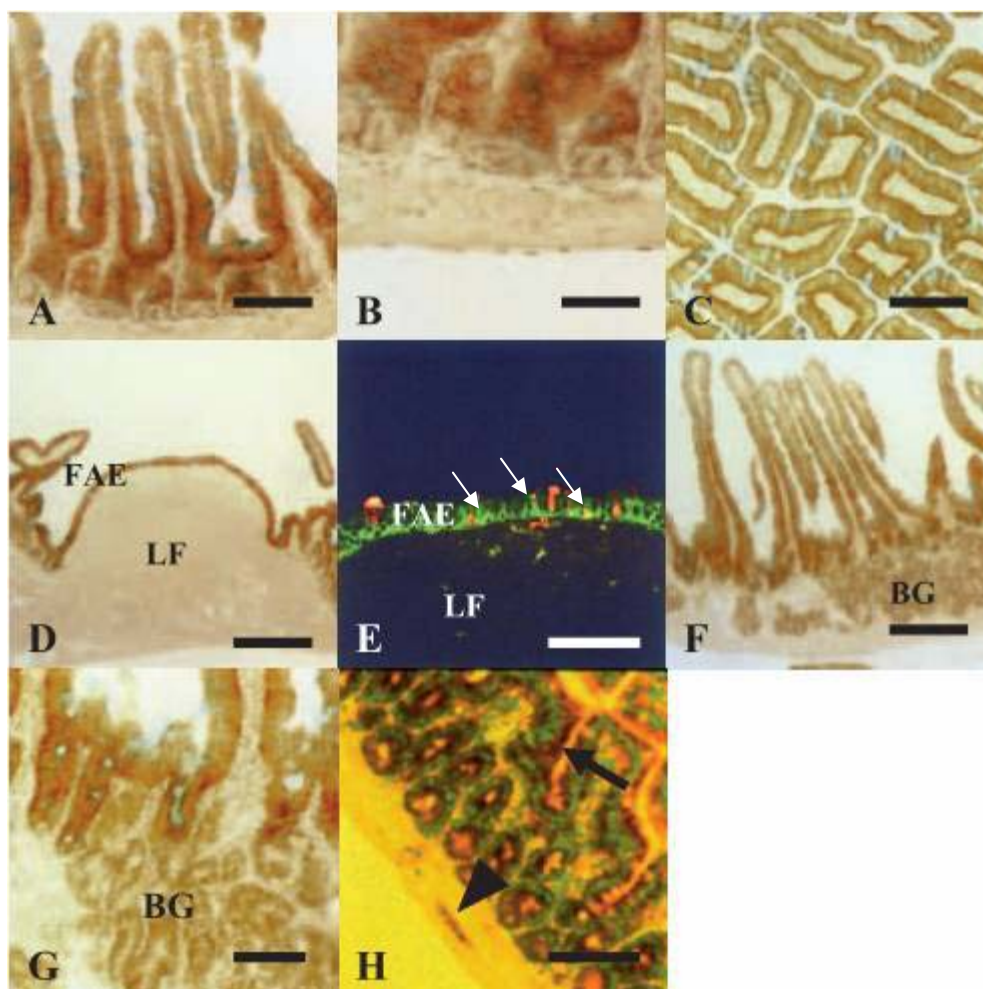
Focalizando la descripción sobre el colon, se observó que el péptido VIC/ET-2 presenta una fuerte señal en las regiones apicales de las células epiteliales superficiales (25A) tal como se observó para el péptido ET-1 (25B). Se observó un gradiente de expresión de VIC/ET-2 en las criptas del colon, destacándose una fuerte señal en la parte superior de éstas y una señal más débil hacia la región basal (25A). El que la inmunomarcación de VIC/ET-2 fuese más intensa en la vecindad de la membrana basal de las células epiteliales se hizo más obvio en el íleon (26A) que en colon (25A). A lo largo del eje de las criptas en el íleon (26A) se encontró también un gradiente de expresión para VIC/ET-2, pero su patrón de distribución resultó inverso al del colon (25A), ya que la señal fue más intensa en la parte inferior del eje que recorre la cripta (26A). Los estudios realizados sobre secciones transversales del íleon también confirmaron esta distribución (26C). En las placas de Peyer, la expresión para VIC/ET-2 verificada utilizando la técnica de DAB fue intensa en las células del tejido epitelial asociado a los folículos (FAE) mientras que no se observó inmunomarcación en los folículos linfoides (26D). El FAE está formado por células abortivas y células M; estas últimas conforman el centro de inmunidad de la mucosa y son específicamente reconocidas con la lectina UEA-I que se une selectivamente a los residuos de

fucosa (Giannasca y col., 1994). Para dilucidar si la distribución de VIC/ET-2 en el epitelio incluye, además de las células absortivas a las células M, se utilizó una reacción de fluorescencia marcando dichas células con la lectina UEA-I conjugada al fluoróforo RITC y anti-VIC/ET-2 conjugada a FICT. En algunas de las células M de dicho epitelio se verifica señal positiva para ambas moléculas, confirmando la presencia de este péptido en dichas células (26E, ver flechas). En el epitelio folicular, el VIC/ET-2 fue localizado en la vecindad de la membrana basal, en coincidencia con otras regiones intestinales. En el duodeno una intensa inmunomarcación fue observada en las células epiteliales de las vellosidades intestinales y en las glándulas de Brunner, aunque en estas últimas el cromógeno precipitado aparece más débil (26F y G).



**Figura 25:** Inmunomarcación de VIC/ET-2 y ET-1 en colon normal de ratón. Se presentan secciones longitudinales (A-F) de la túnica mucosa (A, B, C) y de la túnica muscular (D, E, F); marcadas para VIC/ET-2 (A, D) y ET-1 (B, E) y sus controles (C, F). El color azul indica la tinción con azul de alcian. Barras = 100  $\mu$ m (A, B) y 50  $\mu$ m (C, D). Las micrografías G-I presentan un estudio de colocalización para VIC/ET-2 y VIP. Secciones longitudinales fueron marcadas con anticuerpos contra VIC/ET-2 (G, I: verde) y con anticuerpos contra VIP (H, I: rojo). Las imágenes combinadas se presentan en I (amarillo). Algunas células neuronales (ver flechas) y del plexo mientérico (ver cabeza

de flecha) presentaron marcación para VIC/ET-2 y VIP. Barra = 100  $\mu$ m.



**Figura 26:** Localización del ARNm y del péptido VIC/ET-2 en intestino delgado de un ratón normal. Inmunomarcación del péptido VIC/ET-2 en íleon (A-C). Se presentan secciones longitudinales de la túnica mucosa (A), túnica muscular (B) y secciones transversales de las vellosidades epiteliales (C). La tonalidad celeste corresponde al contrastado con la tinción de azul de alcian. Barras = 50  $\mu$ m (A) y 25  $\mu$ m (B, C). Localización de VIC/ET-2 en las placas de Peyer (D, E). FAE: epitelio asociado al folículo, LF: folículo linfoide (D). Doble marcación con anticuerpo para VIC (verde) y con la lectina UEA-I que se une a residuos fucosa (marcador de células M, en rojo) (E). Barras = 100  $\mu$ m (D) y 25  $\mu$ m (E). Distribución del ARNm y del péptido VIC/ET-2 en duodeno (F-H). Inmunomarcación para VIC/ET-2. El color celeste indica la tinción con azul de alcian. BG: glándulas de Brunner (F, G). Hibridación *in situ* para VIC/ET-2 (H). Secciones hibridadas con la sonda anti-sentido, señales para VIC/ET-2 (marrón oscuro, ver flechas), se observaron principalmente rodeando la región del núcleo (verde) en las células epiteliales. El ARNm para VIC/ET-2 fue localizado también en el plexo mientérico (ver cabeza de flecha) (H). Barra = 100  $\mu$ m (F) y 50  $\mu$ m (G, H).

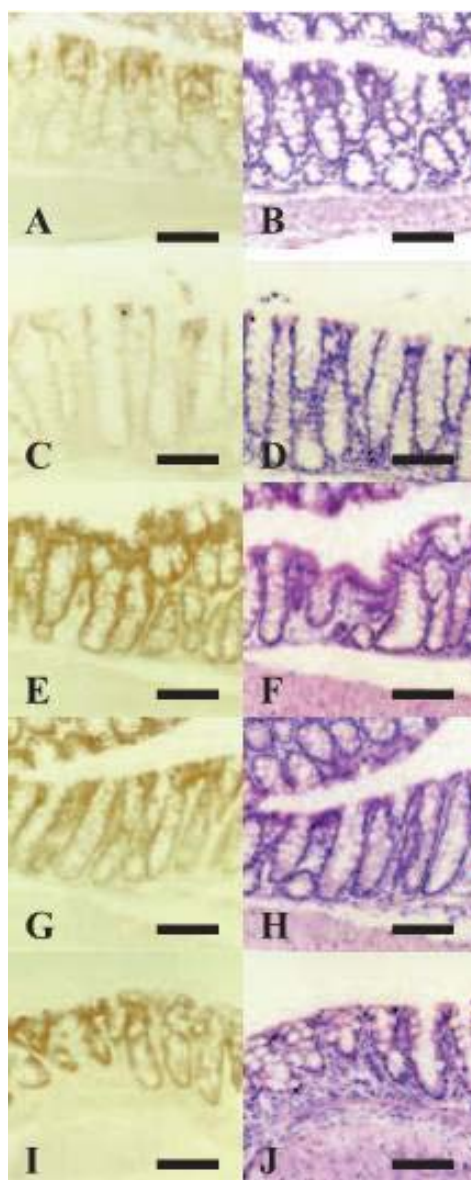
Para confirmar la inmunorreactividad de VIC/ET-2 en la túnica muscular del intestino, se realizó una doble inmunomarcación para VIC/ET-2 y VIP. Éste último es un neuropéptido que se expresa en las neuronas intestinales –incluidas las neurofibras separadoras y el plexo mientérico (Sundler y col., 1988)–. La inmunomarcación para VIC/ET-2 fue observada en neurofibras y en

el plexo mientérico de la túnica muscular del colon (25D y 25G), una débil inmunomarcación se observó también en la túnica muscular de otras zonas intestinales (26B). En algunas neurofibras y células del plexo mientérico VIC/ET-2 colocalizó con VIP (25I).

Para determinar la distribución celular del ARNm para VIC/ET-2 en duodeno se realizó una hibridación *in situ*. El ARNm para VIC/ET-2 fue localizado principalmente en las células epiteliales (26H) y también en el plexo mientérico (26H). Sin embargo, el ARNm para VIC/ET-2 no se detectó en las células del estroma de la lámina propia (26H). Estos análisis, sumados a los datos inmunohistoquímicos (26F), mostraron que las células del epitelio duodenal expresan fuertemente tanto el ARNm, como el péptido VIC/ET-2.

#### **IV.3-a.4) Estimulación de la expresión de VIC/ET-2 en la inducción experimental de inflamación intestinal.**

Para establecer si el patrón de expresión de VIC/ET-2 en el intestino cambia bajo ciertas condiciones patológicas inducidas, se analizó la distribución del péptido VIC/ET-2 en colon inducido a desarrollar un proceso de colitis ulcerosa (Fig. 27). Al primer día de inducción de dicho proceso, se observó una notable inhibición del péptido (27C) comparándolo con el control (27A). Luego la expresión del péptido presentó un incremento gradual en las células epiteliales del colon a los 3, 5 y 7 días posteriores a la inducción de la colitis (27E, G e I). La inflamación no fue evidente en los días 1, 3 y 5 (27D, F y H), sin embargo al 7<sup>mo</sup> día, el proceso inflamatorio se hizo notorio, verificándose infiltración de células inflamadas y una disminución en las criptas de la túnica mucosa (27J).



**Figura 27:** Inmunomarcación de VIC/ET-2 en colon normal y con colitis ulcerosa. Las secciones fueron tratadas con el anticuerpo para VIC/ET-2 (A, C, E, G, I). En cada caso se usaron secciones adyacentes teñidas con hematoxilina y eosina para su análisis histológico (B, D, F, H, J). Colon normal (día 0, sin tratamiento) (A, B). Colon con colitis (C-J), a día 1 (C, D), a día 3 (E, F), a día 5 (G, H) y a día 7 (I, J). En todos los casos VIC/ET-2 fue detectado exclusivamente en las células epiteliales. El patrón de expresión del péptido VIC/ET-2 se incrementó hacia los últimos días del tratamiento. Se muestran imágenes representativas de los experimentos realizados ( $n = 5$ ). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

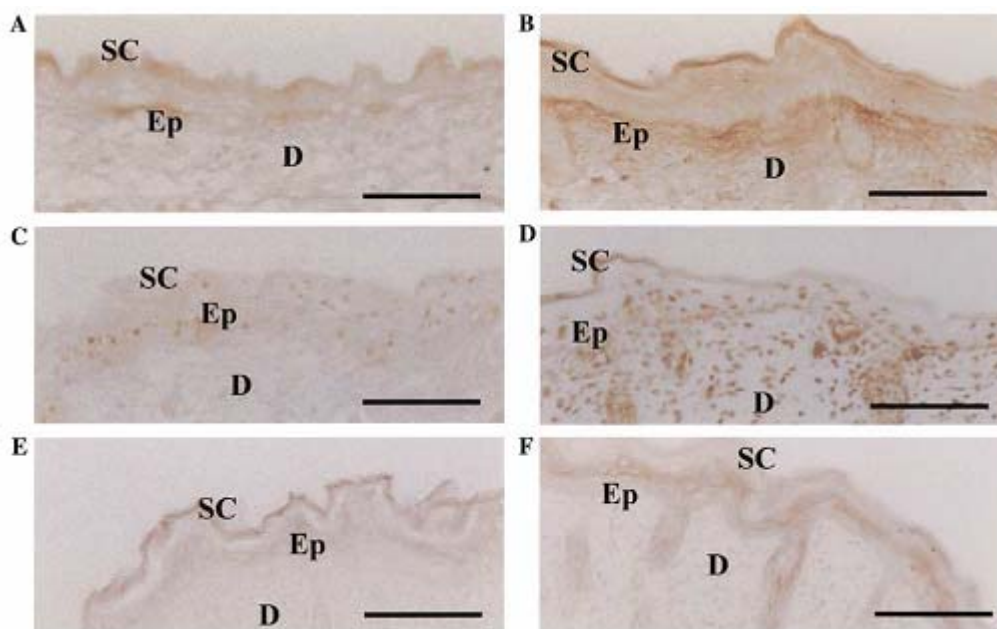
### IV.3-b) Análisis de las ETs en piel

La piel, como primera barrera de defensa del organismo, está sometida al accionar de diferentes agentes químicos, físicos y mecánicos. Sus diferentes capas, subdivididas en estratos sirven de filtro a dichos agentes. Puesto que en esta función de defensa, participan varios mecanismos y diferentes procesos celulares que hacen que las capas epidérmicas y dérmicas sufran transformaciones y dada la relativa abundancia de estos péptidos en piel; se hipotetizó que las

ETs podrían cumplir algún/nos rol/es específicos en este proceso. Para analizar dicha posibilidad se realizó un análisis de la respuesta de las ETs en la piel cuando ésta es sometida artificialmente a radiación ultravioleta.

#### IV.3-b.1) Distribución celular de las ETs en piel

En función del notorio incremento verificado en los niveles de ARNm para VIC/ET-2, ET-1 y sus receptores entre los estadios E17 – N1 (ver sección IV.2-c; Figs. 17 y 19) se estudió la distribución celular del péptido VIC/ET-2 y la de los respectivos receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> en dichos estadios (Fig. 28). El estudio se centró en la epidermis y dermis de la región dorsal de la piel; observándose un incremento de la señal luego del parto (N1) (Fig. 28: B, D, F) respecto al estadio E17 (Fig. 28: A, C, E).



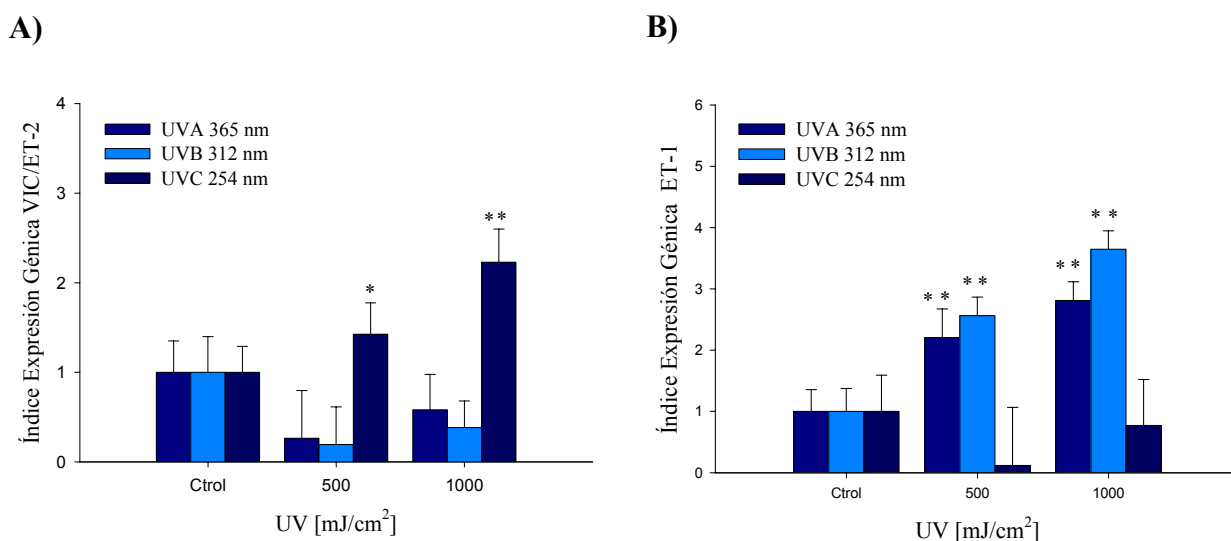
**Figura 28:** Sistema ETs en región dorsal de piel de ratón. (A, B) inmunomarcación para ET<sub>A</sub>, (C, D) inmunomarcación para ET<sub>B</sub> y (E, F) inmunomarcación para VIC/ET-2. A, C y E representan al estadio gestacional E17 y B, D y F representan el día posterior al parto (N1). SC: estrato córneo, Ep: epidermis, D: dermis. Barra = 100  $\mu$ m.

#### IV.3-b.2) Respuesta de las ETs ante la exposición a la radiación ultravioleta

La fase experimental consistió en estudiar el rango de radiación UV capaz de inducir cambios en la expresión génica de VIC/ET-2 y ET-1 en la piel. Se analizaron los efectos de la radiación sobre la síntesis de ARNm de los ligandos en ratones de 4 días de edad, tres horas después de ser expuestos a UV-A (365 nm), UV-B (312 nm) y UV-C (254 nm) usando tanto dosis moderadas (500 mJ/cm<sup>2</sup>) como altas (1000 mJ/cm<sup>2</sup>) (Fig. 29). En estos experimentos se verificó que sólo la radiación UV-C produce un incremento en la expresión de VIC/ET-2 tanto a dosis moderadas



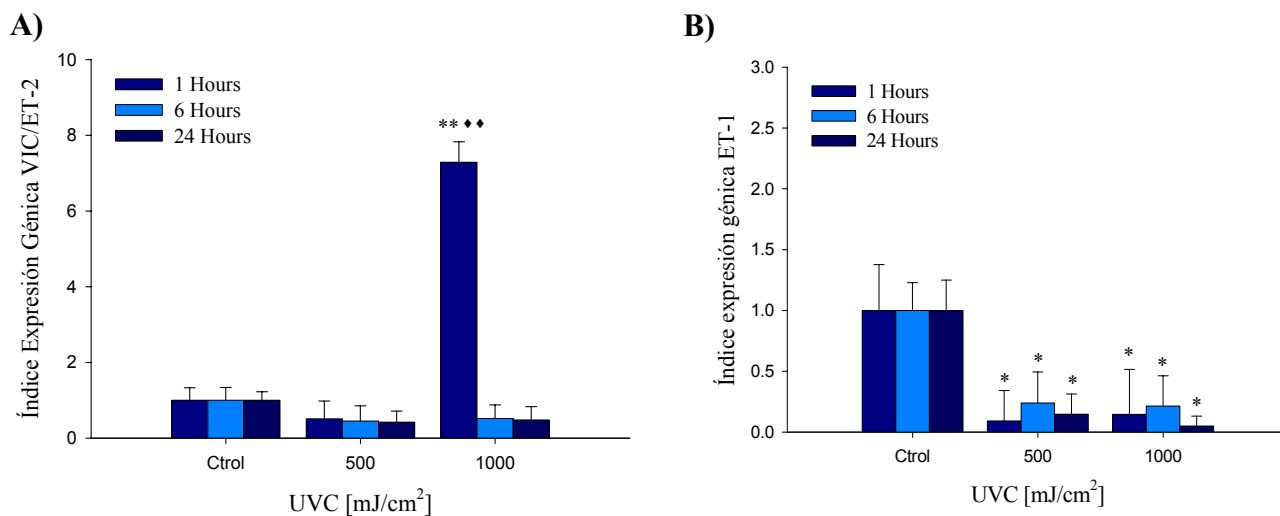
(razón de cambio > 1,4) como altas (razón de cambio > 2,3). Las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ) y muy significativas ( $p < 0.01$ ) respectivamente, cuando se compararon con los organismos sin irradiar (control) (29A). Por el contrario, la expresión de VIC/ET-2 fue inhibida por los tratamientos con UV-A o UV-B (29A). Por otra parte, tanto los tratamientos con UV-A como con UV-B incrementaron la expresión de ET-1 (29B). El aumento en la expresión de ET-1 fue muy significativo: para UV-A a dosis moderada (razón de cambio > 2,2) y a dosis alta (razón de cambio > 2,8); por su parte UV-B a dosis moderada (razón de cambio > 2,6) y a dosis alta (razón de cambio > 3,6). Mientras que ET-1 fue inhibida luego de ser expuesta a la radiación UV-C (29B).



**Figura 29:** Cuantificación relativa de VIC/ET-2 y ET-1 luego de ser expuestos a irradiación UV. Las muestras sin irradiar (control) fueron utilizadas como calibrador. Piel de la región dorsal de neonatos fueron irradiadas con dosis moderada (500 mJ/cm<sup>2</sup>) y alta (1.000 mJ/cm<sup>2</sup>) de radiación UV-A (barras azules), UV-B (barras celestes) y UV-C (barras azul oscuro). Las muestras fueron colectadas a las 3 horas de realizada la exposición. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 5$ ). \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y \*\* indica diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ), comparadas con el control. El valor  $p$  se calculó utilizando un test ANOVA paramétrico con un test de comparación de *Dunnnett*.

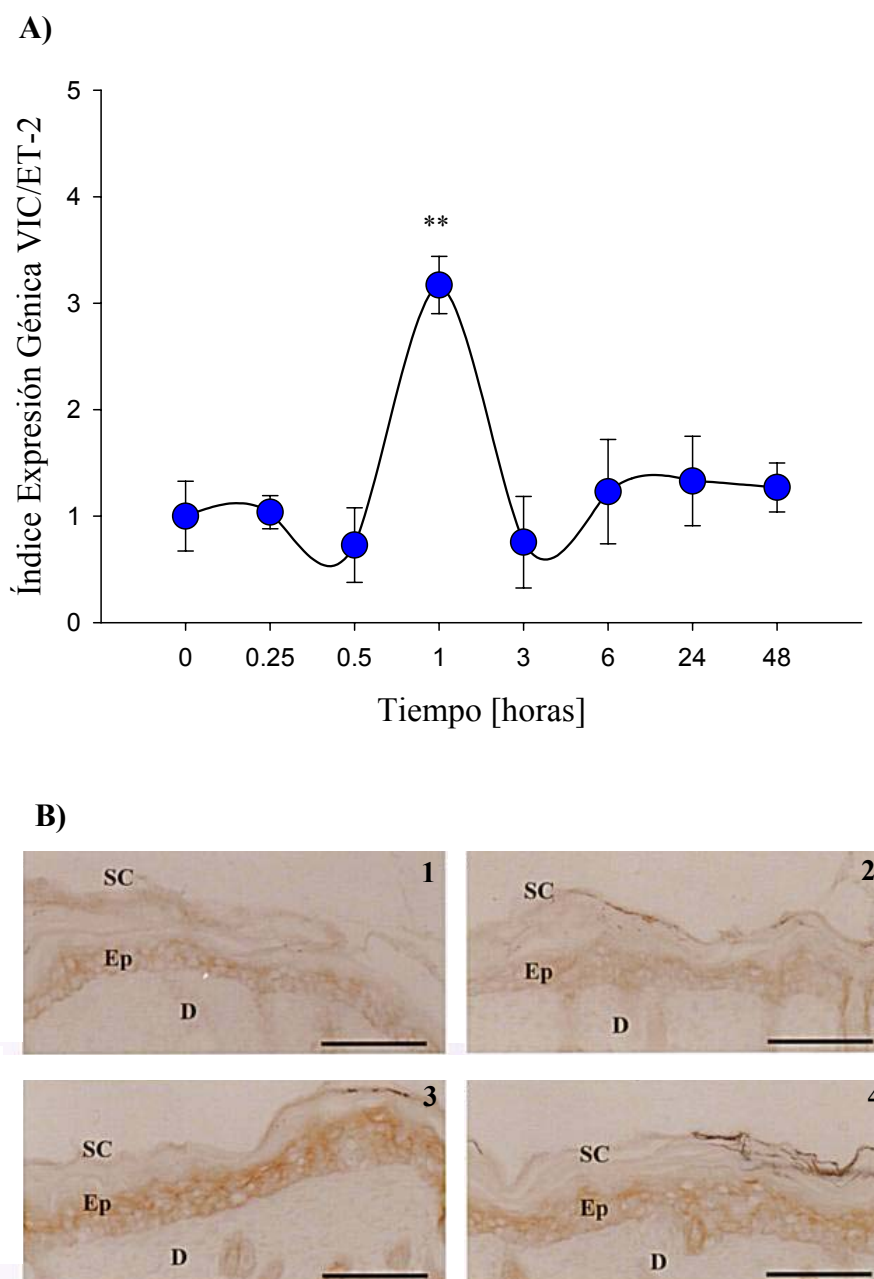
Para profundizar los estudios realizados con la radiación UV-C, se analizaron los cambios en el índice de expresión génica de VIC/ET-2 y ET-1 removiendo la piel a diferentes tiempos post-exposición (Fig. 30). A dosis moderadas, la síntesis de ARNm para VIC/ET-2 fue inhibido en todos los tiempos examinados. A dosis altas, el índice de expresión génica de VIC/ET-2 presentó un incremento a la hora (1h) de la irradiación; exhibiendo marcados descensos a las seis y a las veinticuatro horas. A la hora y a dosis altas, el incremento registrado fue muy significativo (razón de cambio > 7) comparado con el control y la dosis moderada (30A). En contraste, para dosis moderadas y altas, el índice de expresión para ET-1 fue inhibido en forma muy significativa (razón de cambio < 6) a todos los tiempos examinados (30B). Estos resultados

indican que altas dosis de UV-C inducen una inmediata respuesta de VIC/ET-2 en la piel.



**Figura 30:** Cuantificación relativa de VIC/ET-2 y ET-1 luego de ser expuestos a irradiación UV-C. Las muestras sin irradiar (control) fueron utilizadas como calibrador. Piel de la región dorsal de neonatos fueron irradiadas con dosis moderadas (500 mJ/cm<sup>2</sup>) y altas (1.000 mJ/cm<sup>2</sup>) y colectadas para su análisis a 1 hora (barras azules), 6 horas (barras celestes) y 24 horas (barras azul oscuro) luego de la exposición. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 5$ ). \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y \*\* indica diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ), comparadas con el control. ♦: indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y ♦♦: indica diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ), comparadas con la dosis moderada. El valor  $p$  se calculó utilizando un test ANOVA paramétrico con un test de comparación de *Dunnnett*.

Para confirmar los datos previamente mostrados e intentar comprender mejor el comportamiento de VIC/ET-2; se realizó un estudio temporal más exhaustivo tanto analizando la expresión del ARNm como del péptido (Fig. 31). Para ello se utilizaron altas dosis de irradiación UV-C y las muestras fueron analizadas a 0, 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 24 y 48 horas post-irradiación. El índice de expresión génica, se mantuvo prácticamente sin cambios durante los primeros puntos analizados, alcanzando valores máximos a la hora (razón de cambio  $> 3$ ) para retornar a los niveles del control transcurridas las 3 y 6 horas del ensayo (razón de cambio = 1). Se observaron leves incrementos a las 24 y 48 horas (razón de cambio  $> 1,5$ ). El índice de expresión a la hora fue muy significativo comparado con los puntos subsiguientes (31A). El análisis inmunohistoquímico mostró valores incrementados del péptido a las 24 horas luego de la irradiación (31B). En las muestras obtenidas a 1 y 6 horas post-irradiación, la inmunomarcación fue débil en los queratinocitos de la capa epidérmica subyacente al estrato córneo. A las 24 horas, la señal de inmunomarcación del péptido VIC/ET-2 se mostró incrementada, comprendiendo prácticamente todas las capas de la epidermis (31B).

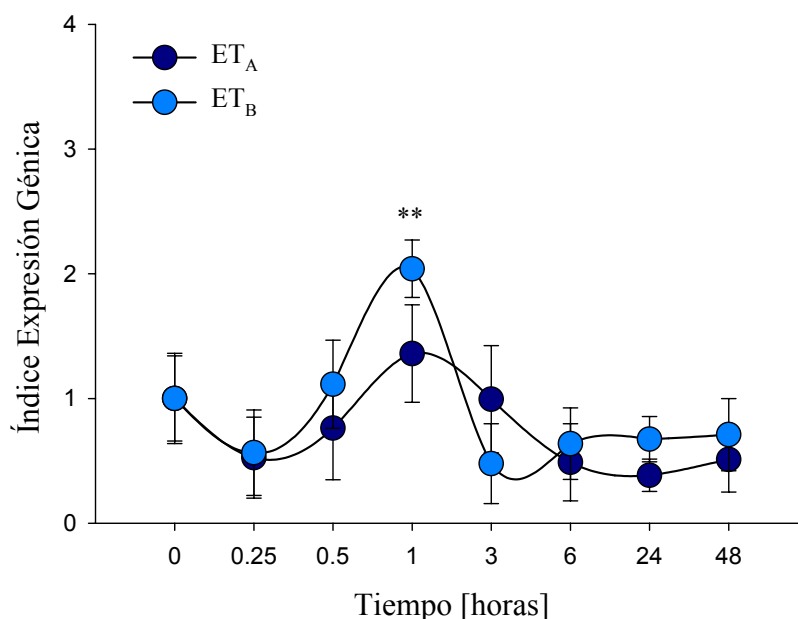


**Figura 31:** Análisis temporal de la expresión del ARNm y del péptido VIC/ET-2 luego de ser expuesto a irradiación UV-C. La irradiación se realizó utilizando dosis altas (1.000 mJ/cm<sup>2</sup>). (A) Cuantificación relativa del gen VIC/ET-2. Las muestras al tiempo 0 fueron utilizadas como calibrador. El máximo índice de expresión se registró a la hora (razón de cambio > 3). Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 5$ ). \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y \*\* indica diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ), comparadas con el control (tiempo 0). El valor  $p$  se calculó utilizando un test ANOVA paramétrico con un test de comparación de *Dunnett*. (B) Inmunomarcación de VIC/ET-2 en piel de neonatos a 1h (B1), 6h (B2), 24h (B3) y 48h (B4) luego de la irradiación. El mayor nivel de expresión se registró a las 24 hs (B3) en la región epidérmica. SC: estrato córneo, Ep: epidermis, D: dermis. Barra = 100  $\mu$ m. Se presentan imágenes representativas de experiencias repetidas ( $n = 3$ ).

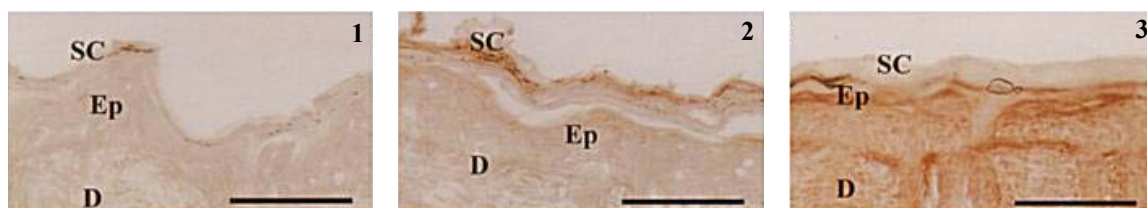
Un análisis similar al presentado en la figura 31, se realizó para los receptores (Fig. 32). El estudio temporal a nivel de expresión génica, mostró que ambos receptores exhiben un incremento en su índice de expresión promediando la hora post-irradiación. Sin embargo, puede verificarse que la expresión del receptor ET<sub>B</sub> fue significativamente mayor que el de ET<sub>A</sub>. A la hora, el índice de expresión de ET<sub>A</sub> fue significativo ( $p < 0.05$ ) sólo cuando se lo comparó con los ensayos de 24 hs y 48 hs. Por otra parte, el índice de expresión de ET<sub>B</sub> fue muy significativo ( $p < 0.01$ ) cuando se lo comparó con todos los tiempos analizados (32A). En el estudio inmunohistoquímico, la inmunomarcación para ET<sub>A</sub> fue detectada a las 48 hs luego de la irradiación (32B), siendo la señal muy débil para los restantes tiempos examinados. La expresión de ET<sub>B</sub> por el contrario, mostró un incremento gradual a través de todo el rango temporal examinado. La señal más intensa se observó a las 48 hs post-irradiación (32C). Ambos receptores se encontraron ampliamente distribuidos en la epidermis y la dermis.

Estos resultados demuestran que el comportamiento de VIC/ET-2 y los receptores es dependiente del tiempo, puesto que la expresión a nivel génico exhibe valores máximos a la hora, mostrando un retardo de 24 hs en los procesos de traducción y procesamiento de los péptidos y receptores.

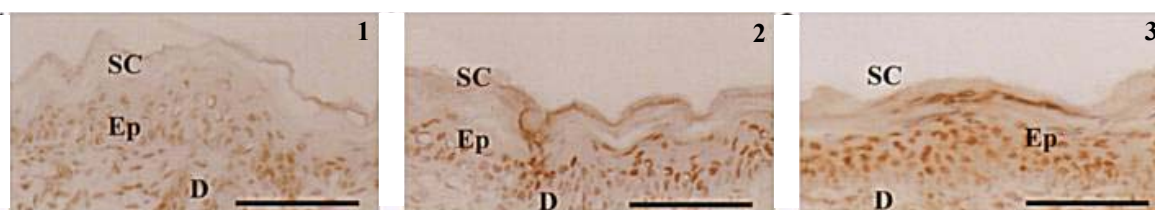
A)



B)



C)

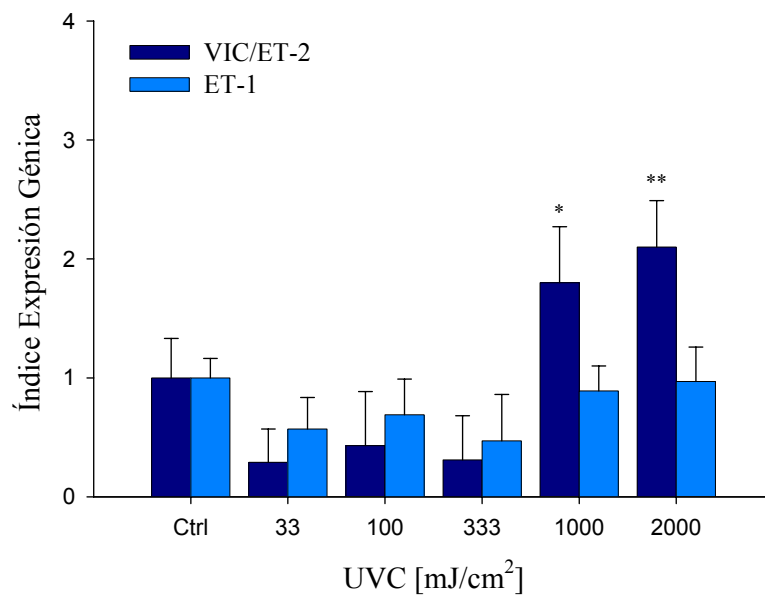


**Figura 32:** Análisis temporal de la expresión del ARNm y proteica de los receptores ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> luego de ser expuesto a irradiación UV-C. La irradiación se realizó utilizando dosis altas (1.000 mJ/cm<sup>2</sup>). (A) Cuantificación relativa de los genes ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. Las muestras al tiempo 0 fueron utilizadas como calibrador. El máximo índice de expresión se registró a la hora. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 5$ ). \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y \*\* indica diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ), comparadas con el control (tiempo 0). El valor  $p$  se calculó utilizando un test ANOVA paramétrico con un test de comparación de *Dunnnett*. (B) Inmunomarcación de ET<sub>A</sub> en piel de neonatos a 6h (B1), 24h (B2) y 48h (B3) luego de la irradiación. El mayor nivel de expresión se registró a las 48 hs (B3) en la región epidérmica. (C) Inmunomarcación de ET<sub>B</sub> en piel de neonatos a 6h (C1), 24h (C2) y 48h (C3) luego de la irradiación. El nivel de expresión mostró un incremento gradual en la región epidérmica. SC: estrato córneo, Ep: epidermis, D: dermis. Barra = 100  $\mu$ m. Se presentan imágenes representativas de experiencias repetidas ( $n = 3$ ).

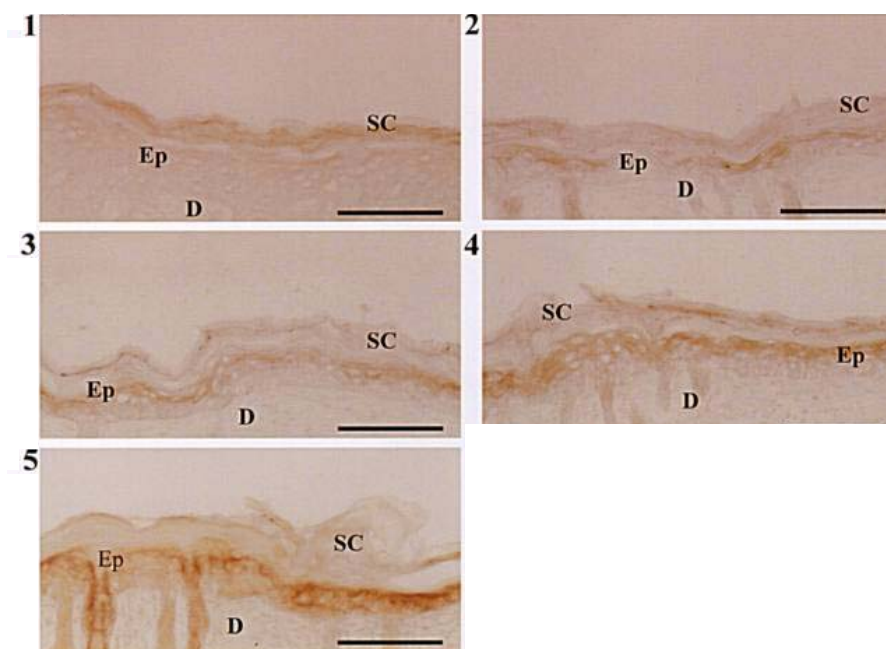
Con el objetivo de confirmar si VIC/ET-2 respondía únicamente para altas dosis, se diseñó un experimento en el que se utilizaron cinco dosis. El estudio se condujo sobre los dos ligandos (VIC/ET-2 y ET-1), utilizando las siguientes dosis, bajas: 33 (mJ/cm<sup>2</sup>) y 100 (mJ/cm<sup>2</sup>), moderada: 333 (mJ/cm<sup>2</sup>) y altas: 1000 (mJ/cm<sup>2</sup>) y 2000 (mJ/cm<sup>2</sup>). Dado el comportamiento verificado previamente (Fig. 31), la expresión de ARNm para VIC/ET-2 y ET-1 se analizó una hora después de efectuada la exposición y la inmunomarcación a las 24 hs de efectuada la exposición (Fig. 33). Se observó que ninguna de las dosis de UV-C examinadas produjo inducción en el índice de expresión génica de ET-1. Por otro lado, sólo a altas dosis de UV-C se verificaron incrementos en el índice de expresión de ARNm para VIC/ET-2. El incremento fue significativo para 1000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (razón de cambio > 1,8) y muy significativo para 2000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (razón de cambio > 2,2) comparadas con el control (33A). A nivel inmunohistoquímico, el VIC/ET-2 aumenta en la epidermis de manera dosis dependiente por efecto de la radiación UV-C (33B). La máxima intensidad del cromógeno se detectó a altas dosis. El patrón de expresión se ubicó principalmente en las capas de la epidermis, justo por debajo del estrato córneo, alcanzando a altas dosis, algunas células del estrato espinoso y del estrato basal. Se observó también un incremento en el espesor de la epidermis, el cuál resultó proporcional con el aumento de la dosis (33B). Sin embargo, para ET-1 corroborando los resultados obtenidos en los estudios de la expresión génica, no se detectó inmunomarcación para ninguna de las dosis evaluadas (33C).

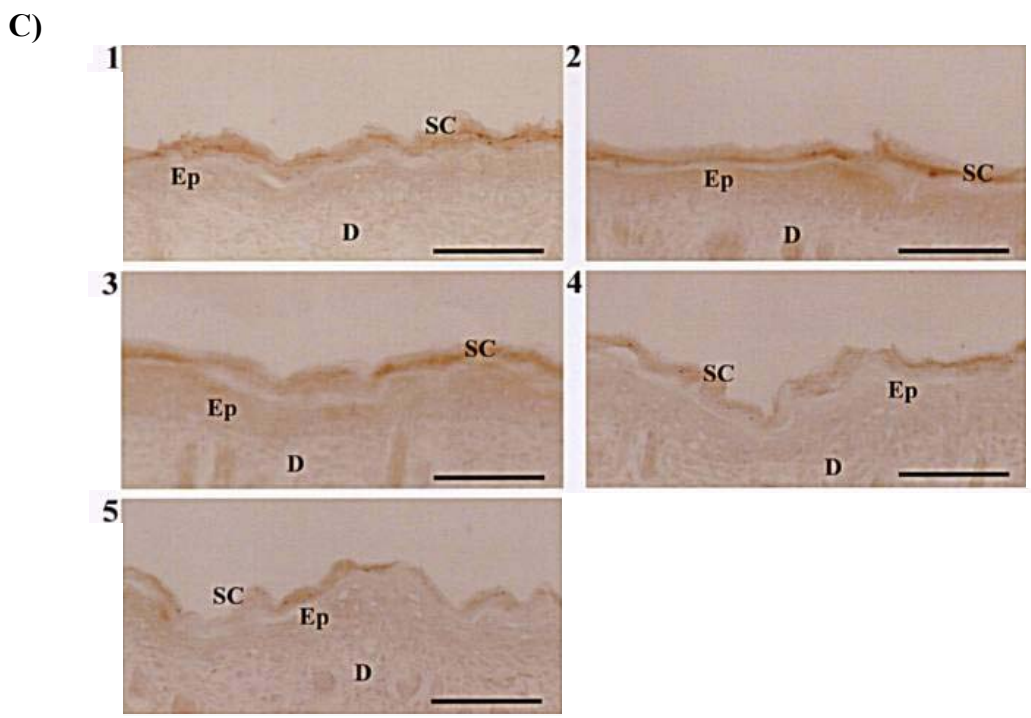
Similar análisis pero para los receptores se presenta en la figura 34. Los resultados son similares a los hallados para VIC/ET-2. Se detectó un incremento en el índice de expresión génica para ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> solamente para altas dosis. Para ET<sub>A</sub>, el incremento fue significativo para 1000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (razón de cambio > 2,2) y muy significativo para 2000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (razón de cambio > 2,6) comparadas con el control (34A). Para ET<sub>B</sub>, el incremento fue muy significativo para 1000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (razón de cambio > 2,3) y significativo para 2000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (razón de cambio > 1,9) comparadas con el control (34A). Con respecto al comportamiento a nivel inmunohistoquímico, los estudios mostraron señal para ET<sub>A</sub> (34B) y ET<sub>B</sub> (34C) sólo a dosis altas. La marca fue localizada (con algunas diferencias) principalmente en las regiones dérmicas y epidérmicas

A)



B)

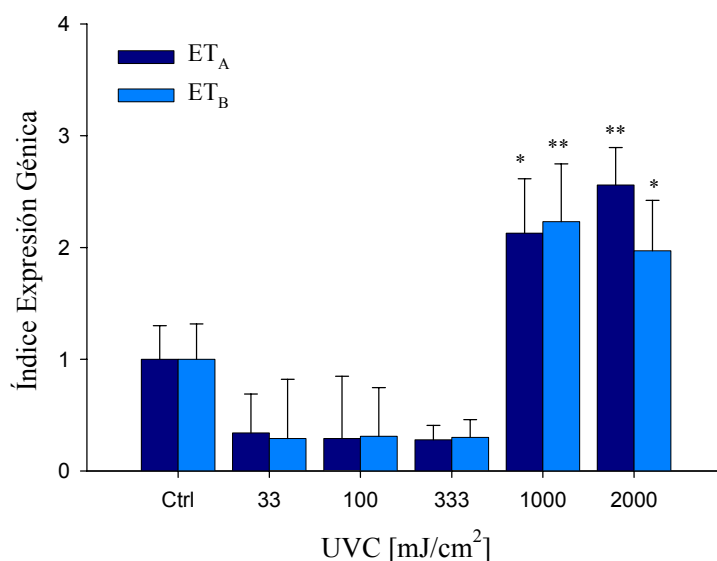




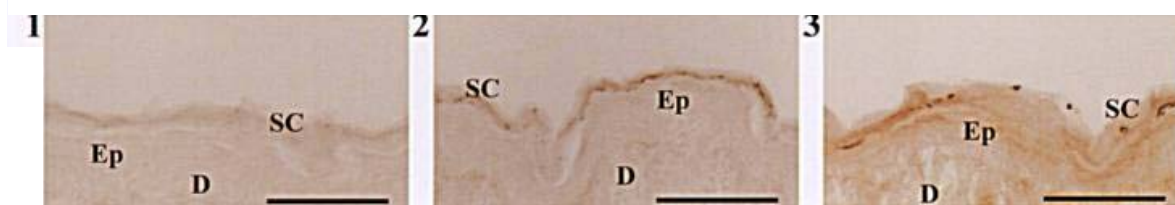
**Figura 33:** Análisis de la expresión de ARNm para VIC/ET-2 y ET-1 y la localización inmunohistoquímica de los péptidos, luego de exponer la piel a cinco dosis diferentes de radiación UV-C. (A) Cuantificación relativa de los genes VIC/ET-2 (barra azul) y ET-1 (barra celeste). Las muestras sin irradiar (control) fueron utilizadas como calibrador. El máximo índice de expresión se registró para dosis altas [1.000 (mJ/cm<sup>2</sup>) y 2000 (mJ/cm<sup>2</sup>)]. Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 5$ ). \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y \*\* indica diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ), comparadas con el control. El valor  $p$  se calculó utilizando un test ANOVA paramétrico con un test de comparación de *Dunnnett*. (B) Inmunomarcación de VIC/ET-2 en piel de neonatos expuestos a las siguientes dosis de UV-C: 33 (mJ/cm<sup>2</sup>) (B1), 100 (mJ/cm<sup>2</sup>) (B2), 333 (mJ/cm<sup>2</sup>) (B3), 1.000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (B4) y 2.000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (B5). El mayor nivel de expresión se registró en la región epidérmica para altas dosis de radiación (B4 y B5). (C) Inmunomarcación de ET-1 en piel de neonatos expuestos a las siguientes dosis de UV-C: 33 (mJ/cm<sup>2</sup>) (C1), 100 (mJ/cm<sup>2</sup>) (C2), 333 (mJ/cm<sup>2</sup>) (C3), 1.000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (C4) y 2.000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (C5). No se detectó inmunomarcación para ninguna de las dosis utilizadas. SC: estrato córneo, Ep: epidermis, D: dermis. Barra = 100  $\mu$ m. Se presentan imágenes representativas de experiencias repetidas ( $n = 3$ ).



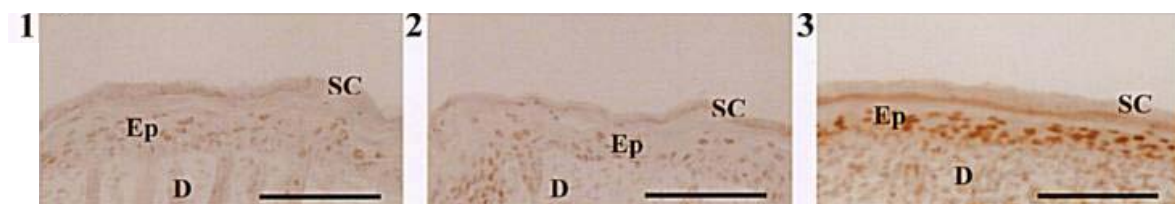
A)



B)

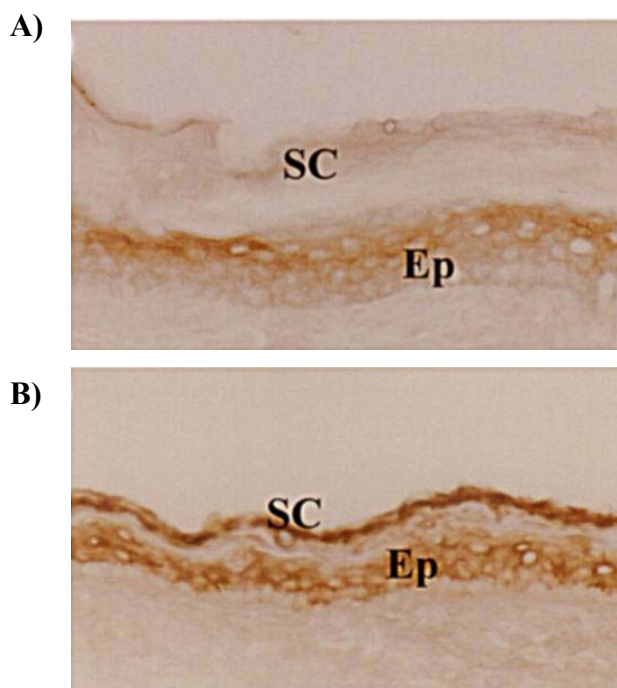


C)



**Figura 34:** Análisis de la expresión de ARNm para ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub> y la localización inmunohistoquímica de los receptores luego de ser expuesto a cinco dosis diferentes de radiación UV-C. (A) Cuantificación relativa de los genes ET<sub>A</sub> (barra azul) y ET<sub>B</sub> (barra celeste). Las muestras sin irradiar (control) fueron utilizadas como calibrador. El máximo índice de expresión se registró para dosis altas (1.000 (mJ/cm<sup>2</sup>) y 2000 (mJ/cm<sup>2</sup>)). Los resultados se expresan como  $m \pm ds$  ( $n = 5$ ). \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y \*\* indica diferencias muy significativas ( $p < 0,01$ ), comparadas con el control. El valor  $p$  se calculó utilizando un test ANOVA paramétrico con un test de comparación de *Dunnnett* (B) Inmunomarcación de ET<sub>A</sub> en piel de neonatos expuestos a las siguientes dosis de UV-C: 0 (mJ/cm<sup>2</sup>) (B1), 100 (mJ/cm<sup>2</sup>) (B2) y 1.000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (B3). El mayor nivel de expresión se registró en la región epidérmica para altas dosis de radiación (B3). (C) Inmunomarcación de ET<sub>B</sub> en piel de neonatos expuestos a las siguientes dosis de UV-C: 0 (mJ/cm<sup>2</sup>) (C1), 100 (mJ/cm<sup>2</sup>) (C2) y 1.000 (mJ/cm<sup>2</sup>) (C3). Se detectó que el patrón de inmunomarcación aumenta en proporción con la dosis utilizada (C2 y C3). SC: estrato córneo, Ep: epidermis, D: dermis. Barra = 100  $\mu$ m. Se presentan imágenes representativas de experiencias repetidas ( $n = 3$ ).

Estos resultados, permiten postular que, altas dosis de radiación UV-C inducen un incremento en la expresión génica y peptídica para VIC/ET-2. Concordantemente el análisis inmunohistoquímico, permite determinar que la localización de VIC/ET-2 se da fundamentalmente en la región de la epidermis. Para caracterizar el tipo de células VIC/ET-2 positivas, se realizó una inmunomarcación seriada utilizando el anticuerpo K10, que permite identificar diferencialmente a los filamentos intermedios de los queratinocitos. La figura 35 presenta los resultados del estudio sobre secciones seriadas para VIC/ET-2 (35A) y K10 (35B). Comparando las imágenes, se observa que las células epidérmicas del estrato espinoso positivas para VIC/ET-2, lo fueron también para K10; confirmando su tipología. Estos resultados confirman que son los queratinocitos de la epidermis los que producen el péptido VIC/ET-2 luego de la exposición a la radiación UV-C.



**Figura 35:** Inmunomarcación de VIC/ET-2 en queratinocitos luego de la exposición a altas dosis de UV-C. Se efectuó una inmunomarcación utilizando secciones seriadas (A) contra VIC/ET-2 y (B) contra K10 (anticuerpo que marca específicamente los queratinocitos de la epidermis). La inmunomarcación de VIC/ET-2 y K10 se observa principalmente en los queratinocitos del estrato espinoso. La inmunomarcación de VIC/ET-2 y K10 se localizó principalmente en la zona citoplasmática de los queratinocitos. SC: estrato córneo, Ep: epidermis, Barra = 100  $\mu$ m. Se presentan imágenes representativas de experiencias repetidas ( $n = 3$ ).