

## ÍNDICE

<b>TRABAJOS PUBLICADOS</b>	Pág. 7
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	Pág. 9
<b>I- INTRODUCCIÓN</b>	Pág. 11
<u>I.1- ENDOTELINAS EN HUMANOS</u>	Pág. 12
1-a) Sistema Endotelina	Pág. 12
1-b) Biosíntesis de las endotelinas	Pág. 13
1-c) Receptores de endotelinas	Pág. 15
1-d) Regulación de las endotelinas	Pág. 18
1-e) Efectos biológicos	Pág. 19
<u>I.2 - ENDOTELINAS EN MURINOS</u>	Pág. 21
2-a) Sistema endotelina en ratón	Pág. 21
2-b) Análisis de la secuencia y estructura del gen VIC/ET-2	Pág. 21
2-c) Estudios sobre las funciones del gen VIC/ET-2	Pág. 26
2-d) Análisis de la expresión génica de VIC/ET-2 usando PCR en tiempo real	Pág. 27
<u>I.3 – ESTUDIOS ESPECÍFICOS SOBRE VIC/ET-2 Y ET-1</u>	Pág. 29
3-a) Identificación de sistemas con distribución y expresión diferencial del gen VIC/ET-2	Pág. 29 Pág. 30
3-b) Nuevos roles fisiológicos del gen VIC/ET-2 identificados en intestino y en piel de ratón	Pág. 31
b.1) VIC/ET-2 en la mucosa intestinal	Pág. 32
b.2) VIC/ET-2 en piel y su comportamiento frente a la exposición UV	
<b>II - OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>	Pág. 33
<b>III - MATERIALES Y MÉTODOS</b>	Pág. 34
<u>III.1- ANIMALES UTILIZADOS</u>	Pág. 35
<u>III.2- PURIFICACIÓN DEL ARN</u>	Pág. 35
<u>III.3- ADN COMPLEMENTARIO. TRANSCRIPCIÓN REVERSA</u>	Pág. 36
<u>III.4- AMPLIFICACIÓN EN TIEMPO REAL DEL ADN</u>	Pág. 36
4-a) Componentes utilizados en la reacción	Pág. 36
4-b) Diseño de los cebadores	Pág. 37
4-c) Diseño de la sonda fluorescente	Pág. 38
4-d) Instrumentación y condiciones de la amplificación	Pág. 39
<u>III.5 - CUANTIFICACIÓN DE LA FLUORESCENCIA EN TIEMPO REAL</u>	Pág. 40
5-a) Análisis de la amplificación	Pág. 40
5-b) Cuantificación	Pág. 42

---

b.1) Cuantificación absoluta	Pág. 42
b.2) Cuantificación relativa	Pág. 43
<u>III.6 - ANÁLISIS HISTOQUÍMICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS</u>	Pág. 45
6-a) Intestino	Pág. 45
6-b) Piel	Pág. 46
<u>III.7- HIBRIDACIÓN IN SITU</u>	Pág. 46
<u>III.8- INDUCCIÓN DE COLITIS ULCEROSA</u>	Pág. 47
<u>III.9- EXPOSICIÓN A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA</u>	Pág. 47
<u>III.10- REGISTRO DE LAS IMÁGENES</u>	Pág. 49
<u>III.11- ESTADÍSTICA EMPLEADA</u>	Pág. 49
<b>IV – RESULTADOS</b>	Pág. 51
<u>IV.1- VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA</u>	Pág. 51
1-a) Confirmación de la especificidad de los cebadores	Pág. 51
1-b) Variabilidad de la técnica	Pág. 53
1-c) Confirmación de la invariabilidad del gen utilizado para la normalización	Pág. 53
1-d) Eficiencia y linealidad de la amplificación	Pág. 55
<u>IV.2- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ENDOTELINAS</u>	Pág. 56
2-a) Expresión de VIC/ET-2 y ET-1 en animales adultos	Pág. 56
2-b) Expresión de ET <sub>A</sub> y ET <sub>B</sub> en animales adultos	Pág. 57
2-c) Expresión de VIC/ET-2 y ET-1 en embriones	Pág. 58
2-d) Expresión de ET <sub>A</sub> y ET <sub>B</sub> en embriones	Pág. 61
<u>IV.3- ANÁLISIS DE LAS ETs EN INTESTINO Y PIEL</u>	Pág. 63
3-a) Análisis de las ETs en intestino	Pág. 63
a.1) Expresión génica de ligandos y receptores en el tracto intestinal	Pág. 63
a.2) Distribución celular de VIC/ET-2 y receptores (ET <sub>A</sub> y ET <sub>B</sub> ) en el tracto intestinal	Pág. 65
a.3) Distribución celular de VIC/ET-2	Pág. 68
a.4) Estimulación de la expresión de VIC/ET-2 en la inducción experimental de inflamación intestinal	Pág. 71
3-b) Análisis de las ETs en piel	Pág. 72
b.1) Distribución celular de las ETs en piel	Pág. 73
b.2) Respuesta de las ETs ante la exposición a la radiación ultravioleta	Pág. 73
<b>V – DISCUSIÓN y CONCLUSIONES</b>	Pág. 84
<u>V.1- LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL EN EL SISTEMA ETs</u>	Pág. 84
<u>V.2- ROLES DEL SISTEMA DE LAS ETs EN RATONES ADULTOS</u>	Pág. 86
<u>V.3- ROL DEL SISTEMA DE LAS ETs DURANTE EL DESARROLLO</u>	Pág. 106

EMBRIONARIO

<b>VI – RESUMEN</b>	Pág. 111
<b>VII – BIBLIOGRAFÍA</b>	Pág. 115
<b>VIII – ANEXO</b>	Pág. 142
<b>IX – AGRADECIMIENTOS</b>	Pág. 153

## TRABAJOS PUBLICADOS

Parte de los resultados discutidos en la presente tesis dieron origen a ocho publicaciones, que se listan a continuación:

### Año 2000

1- Uchide, T.; **Adur, J.**; Fukamachi, T.; Saida K. "Quantitative analysis of endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor / endothelin-2 gene expression in rats by real-time RT-PCR". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36: 5-8.

### Año 2001

2- Uchide, T.; **Adur, J.**; Saida, K. "Rapid quantification of murine endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor (VIC) gene expression levels by a real-time PCR system". *J. Biotech.* 84: 187-192.

### Año 2002

3- Uchide, T.; Fujimori, Y.; Sasaki, T.; Temma, K.; **Adur, J.**; Masuo, Y.; Kozakai, T.; Lee, Y.; Saida, K. "Expression of endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor genes in mouse organs during the perinatal period". *Clin. Sci. (Lond)*103: 167-170.

### Año 2003

4- **Adur, J.**; Takizawa, S.; Quan, J.; Uchide, T.; Saida, K. "Increased gene expression and production of murine endothelin receptors after birth". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 700-706.

### Año 2004

5- **Adur, J.**; Uchide, T.; Takizawa, S.; Quan, J.; Saida, K. "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.* 1: 321-328.

6- Takizawa, S.; Uchide, T.; Kozakai, T.; **Adur, J.**; Quan, J.; Saida, K. "Immunolocalization of Endothelin-B Receptor in Mouse Intestinal Tract". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1: 329-331.

Año 2005

7- Takizawa, S.; Uchide, T.; **Adur, J.**; Kozakai, T.; Kotake-Nara, E.; Quan, J.; Saida, K. “Differential expression of endothelin-2 along the mouse intestinal tract”. *J. Mol. Endocrinol.* 35: 201-209.

Año 2007

8- **Adur, J.**; Takizawa, S.; Uchide, T.; **Casco, V.**; Saida, K. “High doses of ultraviolet-C irradiation increases vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 expression in keratinocytes of the newborn mouse epidermis”. *Peptides* 28: 1083-1094.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%:	Por ciento	dNTP	Desoxiribonucleotido 5' Trifosfato
°C:	Grados centígrados	DSS:	Sulfo de Sodio Dextran
μ:	Micro	Duo:	Duodeno
A <sub>260</sub> :	Absorbancia a 260 nanómetros	dUTP	Desoxiuridin 5' Trifosfato
A <sub>280</sub> :	Absorbancia a 280 nanómetros	E:	Eficiencia
A:	Adenina	E:	Embriones
A:	Adultos	ECE	Enzima Convertidora de Endotelinas
aa:	Aminoácidos	EII:	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
AEC:	Aminoetilcarbazol	ELISA:	Ensayo inmunoabsorbente vinculado a enzimas
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico	Est:	Estómago
ADNc:	ÁDN complementario	ET-1:	Endotelina-1
AMPc	Adenosin 3',5' monofosfato cíclico	ET-2:	Endotelina-2
ARN:	Ácido Ribonucleico	ET-3:	Endotelina-3
ARNm:	ÁRN Mensajero	ET <sub>A</sub> :	Receptor a Endotelina-A
ARNt:	ÁRN de Transferencia	ET <sub>B</sub> :	Receptor a Endotelina-B
Baz:	Bazo	ET <sub>C</sub> :	Receptor a Endotelina-C
Big-ET:	Big-Endotelina	ETs:	Endotelinas
BSA:	Suero Albúmina Bovina	FAE:	Epitelio asociado a folículos
C:	Citosina	FAM:	6-Carboxi fluoresceína
Ca <sup>2+</sup>	Calcio	FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
CCD:	Dispositivo Acoplado por Cargas	FRET:	Transferencia de Energía Fluorescente Mediante Resonancia
Cce:	Corteza cerebral	G:	Guanina
Cel:	Cerebelo	g:	Fuerza centrífuga relativa
Cer:	Cerebro	gr:	Gramos
Ces:	Cuerpo estriado	GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
cm:	Centímetros	GMFc:	Guanosin Monofosfato Cíclico
Cme:	Cerebro medio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de Hidrógeno
Col:	Colon	H <sub>2</sub> O:	Agua
Cor:	Corazón	HCl:	Ácido Clorhídrico
Ct:	Ciclo umbral	Hig:	Hígado
CV:	Coefficiente de Variación	HipC:	Hipocampo
Cys:	Cisteína	HipT:	Hipotálamo
DAB:	Diaminobenzidina	HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Performance
DEPC:	Dietilpirocarbonato	IL:	Interleuquinas
dGTP	Desoxiguanosina 5' Trifosfato	Ile:	Íleon
dH <sub>2</sub> O	Agua destilada	Int:	Intestino
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisfosfato	Tf:	Temperatura de fusión
J:	Joules	TGF:	Factor de Crecimiento Transformante

kb:	Kilobases	Trp:	Triptófano
kg:	Kilogramos	U:	Unidades
l:	Litros	U:	Uracilo
LDL:	Lipoproteína de Baja Densidad	Ute:	Útero
Long:	Longitud	UV:	Ultravioleta
m:	Mili	UV-A:	Ultravioleta A (365 nm)
M:	Molar	UV-B:	Ultravioleta B (312 nm)
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio	UV-C:	Ultravioleta C (254 nm)
Mob:	Médula oblonga	VIC:	Péptido Vasoactivo de Contracción Intestinal
molec:	Moléculas	VIP:	Péptido Intestinal Vasoactivo
n:	Nano	vol:	Volumen
N:	Neonatos	Yey:	Yeyuno
Ova:	Ovario		
p:	Pico		
pb:	Pares de bases		
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas		
PG:	Prostaglandinas		
Pil:	Piel		
PIP2	Fosfoinositol-4,5-difosfato		
PK-A	Proteína Quinasa A		
PK-C	Proteína Quinasa C		
PPAR:	Receptor Activado por Proliferación de Peroxisoma.		
PPET:	Prepro Endotelina		
Pul:	Pulmón		
Rec:	Recto		
Rin:	Riñón		
RITC:	Iciotianato de Rodamina		
RT-PCR:	Transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa		
SNC:	Sistema Nervioso Central		
SRTX:	Sarafotoxina		
SSC:	Sal Citrato de Sodio		
T:	Timina		
Tal:	Tálamo		
TAMRA:	Carboxitetrametil-Rodamina		
Tes:	Testículo		