

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

ENZIMA CONVERTIDORA FRENTE A QUIMASA
MASTOCITARIA EN LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA
INDUCIDA POR ANGIOTENSINA-I. PAPEL DE
FRACTALQUINA EN LA INFLAMACIÓN VASCULAR
CAUSADA POR HUMO DE TABACO.

CHANTAL COMPANY DE LA CALLE

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 12 de maig de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Miguel Payá Peris
- Dra. Eva Delpón Mosquera
- Dr. Vicente Andrés García
- Dra. Concepción Peiró Vallejo
- Dr. Luis Estañ Yago

Va ser dirigida per:
Dra. M^a Jesús Sanz Ferrando

©Copyright: Servei de Publicacions
Chantal Company de la Calle

Dipòsit legal: V-484-2012
I.S.B.N.: 978-84-370-8209-7

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

Facultat de **M**edicina i **O**dontologia

Departamento de Farmacología



Chantal Company de la Calle

TESIS DOCTORAL

**ENZIMA CONVERTIDORA FRENTE A
QUIMASA MASTOCITARIA EN LA
INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA
INDUCIDA POR ANGIOTENSINA-I.**

**PAPEL DE FRACTALQUINA EN LA
INFLAMACIÓN VASCULAR CAUSADA
POR HUMO DE TABACO.**



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

2011

TESIS DOCTORAL

Chantal Company de la Calle

Valencia, 2011



**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**Enzima convertidora frente a quimasa mastocitaria en la
infiltración leucocitaria inducida por angiotensina-I.
Papel de fractalquina en la inflamación vascular causada por
humo de tabaco.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Chantal Company De La Calle

Valencia, 2010

Dña. María Jesús Sanz Ferrando, Catedrática del Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo titulado “ECA frente a quimasa mastocitaria en la infiltración leucocitaria inducida por angiotensina-I. Papel de la FRK en la inflamación vascular causada por humo de tabaco”, presentado por la Lda. **Chantal Company De La Calle** para obtener el grado de doctor, ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología, bajo mi dirección.

Valencia, 2 de Diciembre de 2010

Fdo. Dra. María Jesús Sanz Ferrando

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por las siguientes ayudas:

TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la inflamación vascular causada por ciertos factores de riesgo de aterosclerosis. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas

ENTIDAD FINANCIADORA: Conselleria de Educación, Dirección General de Política Científica. Generalitat Valenciana. Ayudas complementarias para proyectos de I+d para grupos de calidad (ACOMP/2010/129)

TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la inflamación vascular causada por ciertos factores de riesgo de aterosclerosis. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas

ENTIDAD FINANCIADORA: C.I.C.Y.T. (Nº Proyecto SAF2008-03477)

TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio del papel funcional de FRK en la inflamación vascular inducida por angiotensina-II y humo de tabaco

ENTIDAD FINANCIADORA: Conselleria de Sanitat. Generalitat Valenciana (AP-055/08)

TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio de los mecanismos celulares y moleculares que median la actividad proinflamatoria del sistema renina angiotensina

ENTIDAD FINANCIADORA: C.I.C.Y.T. (Nº Proyecto SAF2005-01649)

TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio de nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en

paradigmas experimentales de células humanas aisladas y modelos animales in vivo

ENTIDAD FINANCIADORA: Conselleria de Educación. Generalitat Valenciana (PROMETEO/2008/045)

Beca de Formación de Profesorado Universitario, concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a mi directora, María Jesús, por tu dedicación, tu apoyo y tu orientación en la dirección de esta tesis. Por hacerme ver que con esfuerzo y dedicación se puede recoger un buen fruto a pesar de las dificultades y por enseñarme a no conformarme con lo fácil, sino a conseguir lo mejor y a ser luchadora. Y, a Laura Piqueras, gracias por aportarme tu seguridad para conseguir el resultado final, por tu ayuda y tu optimismo.

A Cris, Elena, Virginia, Yafa, Lara, May, Rafa, Begoña, Arantxa, Mercedes, por compartir tantos momentos, por enseñarme y ayudarme con todo. Por vuestra disponibilidad, vuestra alegría, naturalidad y confianza. Por vuestro cariño y buen humor. Por ayudarme a pasar todos los baches de la tesis, que a vuestro lado solo han sido bachecitos. A Cris aroca, Amelia, Paula y Gassán, gracias por vuestra alegría y vitalidad y sobre todo por vuestro compañerismo.

A todos todos todos mis compañeros del Departamento de Farmacología, con los que he pasado más o menos tiempo, pero siempre con risas, alegrías y mucho apoyo. Gracias por vuestra disponibilidad para ayudarme en todo, por vuestra amabilidad y consejo, por ser personas con las que puedo contar.

Gracias a Esteban Morcillo y Julio Cortijo por dejarme mucho espacio y material para realizar los experimentos.

A Benjamín Sarriá, Luis Estañ y José Luis Ortiz, por su ayuda desinteresada, por el cariño y los ánimos que me habeis dado y por los momentos en los que más que como profesores os comportais como amigos.

A Dora, Amparo, Maruja y, especialmente a Pedro, por su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento sin poner nunca peros, sino todo lo contrario. Muchas gracias.

Al Departamento de Anatomía Patológica, en especial al Dr José Miguel Cerdá- Nicolás por su ayuda con los estudios inmunohistoquímicos presentes en esta tesis, por tu cercanía y tu consejo.

Gracias al Dr. Vicente Andrés y a todo su grupo, por su dedicación y ayuda en todo momento.

A la Dra. McCafferty y todo su grupo, por ayudarme en mi formación y aportarme mucho conocimiento.

A mi familia y a mi padre, por estar siempre.

A mi madre, por su cariño, por su confianza en mi, por transmitirme su ánimo, su alegría y su fuerza. Por ser mi guía y mi ejemplo.

A Javi y Ana que siempre están a mi lado apoyándome y animándome en todo.

A Dani, por ser mi motor y animarme siempre en todo, por tu ayuda, por tu cariño y por hacerme reír!!

A mis amigas por su apoyo incondicional siempre, por estar ahí, por ser tan divertidas, por apoyarme y escucharme en todo momento y por decirme siempre que valgo mucho... muchas gracias, sois las mejores.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis, con los buenos y malos momentos, que de corazón, les agradezco el haberme ofrecido todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobretodo cariño y amistad.

<u>INDICE</u>	Pág.
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	20
1.1 EL PROCESO INFLAMATORIO	21
1.1.1 <u>Consideraciones generales</u>	21
1.1.2. <u>Mediadores de la respuesta inflamatoria</u>	22
1.1.3. <u>Regulación de la infiltración leucocitaria</u>	23
1.1.4. <u>Etapas de la infiltración leucocitaria</u>	25
1.1.4.1. Adhesión primaria y rodamiento.....	25
1.1.4.2. Activación y adhesión firme.....	26
1.1.4.3. Migración y quimiotaxis.....	26
1.2. LA ARTERIOSCLEROSIS	27
1.2.1 <u>Consideraciones generales</u>	27
1.2.2 <u>Bases del proceso de aterogénesis</u>	28
1.2.2.1 Disfunción endotelial.....	28
1.2.2.2 Inicio y evolución de la lesión aterosclerótica.....	29
1.3. LOS MASTOCITOS	33
1.3.1. <u>Consideraciones generales</u>	33
1.3.2. <u>Localización de los mastocitos</u>	34
1.3.3. <u>Clasificación de los mastocitos</u>	34
1.3.4. <u>Activación y liberación del contenido de los gránulos</u>	35
1.3.4.1. Peptidasas mastocitarias.....	37
1.3.5 <u>Mastocitos y aterosclerosis</u>	38
1.3.5.1. Activación de los mastocitos en la placa aterosclerótica.	38
1.3.5.2. Localización de los mastocitos en la placa.....	39
1.3.5.3. Mastocitos y su papel en la acumulación de colesterol..	40

1.3.6. <u>Mastocitos y otras patologías cardiovasculares</u>	41
1.4. LA ANGIOTENSINA-II (Ang-II)	42
1.4.1. <u>Consideraciones generales</u>	42
1.4.2. <u>Vías de síntesis de la Ang-II</u>	43
1.4.2.1. Vías de síntesis de Ang-II dependientes de enzima convertidora (ECA).....	44
1.4.2.2. Vías de síntesis de Ang-II independientes de ECA	46
1.4.3. <u>Caracterización de los receptores de Ang-II</u>	53
1.4.3.1. Caracterización de los receptores AT ₁	54
1.4.3.2. Caracterización de los receptores AT ₂	54
1.4.4. <u>Efectos mediados por los receptores AT₁ y AT₂</u>	55
1.4.5. <u>Papel de la Ang-II en la inflamación</u>	56
1.4.5.1. La Ang-II en la respuesta inflamatoria.....	56
1.4.5.2. Acciones de la Ang-II en la repuesta inflamatoria: Ang-II e infiltración leucocitaria.....	58
1.4.6. <u>La Ang-II en el daño vascular y en la arteriosclerosis</u>	60
1.4.7. <u>Acciones proaterogénicas de la Ang-II</u>	62
1.5. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)	63
1.5.1. <u>Alteraciones morfológicas y funcionales de la EPOC</u>	63
1.5.2. <u>Mecanismos inflamatorios pulmonares en la EPOC</u>	65
1.5.3. <u>Estrés oxidativo en la EPOC</u>	67
1.5.4. <u>Inflamación sistémica en EPOC</u>	71
1.6. FISIOPATOLOGÍA DEL HUMO DEL CIGARRO	73
1.6.1. <u>Propiedades bioquímicas y físicas del humo de cigarro</u>	73
1.6.2. <u>Humo de cigarro, disfunción endotelial y arteriosclerosis</u> ...	74
1.7. FRACTALQUINA (FRK)	76

1.7.1 <u>Estructura y función</u>	76
1.7.2. <u>FRK como agente quimiotáctico</u>	79
1.7.3 <u>FRK y leucocitos</u>	81
1.7.4 <u>FRK y citotoxicidad</u>	82
1.7.5 <u>FRK e inflamación</u>	83
1.7.6 <u>FRK y arteriosclerosis</u>	83
2. <u>OBJETIVOS</u>	85
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	89
3.1. ESTUDIOS REALIZADOS CON ANIMALES	90
<u>3.1.1. Estudio de las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I, CMP 48/80 y humo de tabaco mediante el empleo de la microscopía intravital en el músculo cremáster de ratón</u>	90
3.1.1.1. Animales.....	90
3.1.1.2.- Mantenimiento de los animales.....	90
3.1.1.3.- Preparación de los animales.....	90
3.1.1.4. Determinación de los parámetros leucocitarios.....	92
3.1.1.5.- Estudio de las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I, CMP48/80 y la combinación de ambos estímulos mediante el empleo de la microscopía intravital en el músculo cremáster de ratón.....	93
3.1.1.6.- Estudio de las interacciones leucocito- endotelio inducidas por humo de tabaco en ratones salvajes (CX ₃ CR1 ^{+/+}) y ratones deficientes en el receptor de FRK (CX ₃ CR1 ^{-/-}) mediante el empleo de la microscopía intravital en la microcirculación cremastérica del ratón.....	98
<u>3.1.2. Estudio y cuantificación de la desgranulación mastocitaria in vivo empleando la tinción con azul de toluidina</u>	99
<u>3.1.3. Medida de la actividad formadora de Ang-II de las vías dependientes e independientes de ECA en el músculo cremáster de ratón</u>	100
<u>3.1.4. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos</u>	101

3.1.4.1.- Estudio inmunohistoquímico de la expresión de la ECA en vénulas y arteriolas de la microcirculación del músculo cremáster de ratón.....	101
3.1.4.2.- Estudio inmunohistoquímico de la expresión de FRK en vénulas y arteriolas de la microcirculación del músculo cremáster de ratón.....	102
3.1.4.3.- Estudio inmunohistoquímico de la expresión de la quimasa mastocitaria en vénulas y arteriolas de la microcirculación del músculo cremáster de ratón mediante inmunofluorescencia.....	103
3.1.4.4.- Estudio histológico de preparaciones de pulmón de ratón mediante la tinción de hematoxilina-eosina.....	104
3.1.4.5.- Estudio de los diferentes tipos celulares presentes en el lavado broncoalveolar de ratón mediante recuento celular en cámara de Neubauer y tinción diferencial.....	104
3.1.5. <u>Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los receptores AT_{1A} y AT_{1B} de ratón</u>	105
3.2. ESTUDIOS REALIZADOS CON CÉLULAS HUMANAS.....	109
3.2.1. <u>Obtención de extracto acuoso de humo de tabaco (EHT)</u>...	110
3.2.2. <u>Obtención de cultivos de células endoteliales humanas: HUAEC y HUVEC</u>.....	110
3.2.3. <u>Aislamiento de leucocitos mononucleares a partir de sangre periférica</u>.....	111
3.2.4. <u>Estudio de las interacciones leucocito- endotelio bajo condiciones de flujo</u>.....	112
3.2.4.1. Interacciones leucocito-endotelio en HUAECs y HUVEC estimuladas con EHT.....	114
3.2.5. <u>Silenciamiento de TNFα en HUAEC mediante transfección con ARN de interferencia</u>.....	116
3.2.6. <u>Estudios realizados con citometría de flujo</u>.....	118
3.2.6.1.- Determinación de la expresión del receptor de FRK (CX ₃ CR1) en sangre entera de voluntarios sanos y pacientes EPOC	118

3.2.6.2.- Determinación de la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC estimuladas con EHT.....	120
3.2.7. <u>Estudio de la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC mediante inmunofluorescencia indirecta</u>	123
3.2.8. <u>Estudio de la expresión de FRK mediante Western Blot</u>.....	124
3.2.9.- <u>Estudios realizados mediante PCR</u>.....	126
3.2.9.1.- Estudio de la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC	126
3.2.9.2.- Estudio de la expresión de TNF α en HUAEC.....	128
3.3. REACTIVOS.....	128
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	130
4. <u>RESULTADOS</u>.....	131
4.1. <u>Caracterización de la ECA frente a la quimasa mastocitaria en la infiltración leucocitaria inducida por Ang-I</u>.....	131
4.1.1.- Efecto de Ang-II, Ang-I y CMP48/80 sobre las interacciones leucocito-endotelio en la microcirculación cremastérica del ratón.....	131
4.1.2.- Efecto de losartán, enalapril y quimostatina sobre las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I en la microcirculación cremastérica del ratón.....	134
4.1.3. Efecto de losartán, enalapril, quimostatina y mepiramina sobre la interacción leucocito-endotelio inducida por el CMP48/80 en la microcirculación del músculo cremáster del ratón.....	135
4.1.4. Efecto de la Ang-I, el CMP48/80 y la combinación Ang-I + CMP48/80 sobre las interacciones leucocito-endotelio en la microcirculación cremastérica del ratón.....	136
4.1.5 Medida de la actividad formadora de Ang-II de las vías dependientes e independientes de ECA en el músculo cremáster de ratón in vitro.....	139
4.1.6 Efecto de losartán, enalapril, quimostatina y de la combinación de enalapril + quimostatina sobre las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I+CMP48/80 en la microcirculación cremastérica ratón.....	141

4.1.7. Efecto del cromolín sobre la desgranulación mastocitaria y las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I+CMP48/80 en la microcirculación cremastérica de ratones salvajes y deficientes en mastocitos.....	142
4.2 <u>Papel de la FRK en la inflamación vascular causada por humo de tabaco</u>.....	146
4.2.1. Efecto de la exposición al humo de tabaco sobre la inflamación pulmonar en ratones salvajes (CX ₃ CR1 ^{+/+}) y ratones deficientes en el receptor de FRK (CX ₃ CR1 ^{-/-}).....	146
4.2.2. Efecto de la exposición a humo de tabaco sobre las interacciones leucocito-endotelio en la microcirculación cremastérica de ratones salvajes (CX ₃ CR1 ^{+/+}) y ratones deficientes en el receptor de FRK (CX ₃ CR1 ^{-/-}).....	147
4.2.3. Estudio histológico de la microcirculación cremastérica de los ratones salvajes (CX ₃ CR1 ^{+/+}).....	148
4.2.4. Efecto del EHT sobre la expresión de ARNm de FRK en HUAEC y HUVEC.....	149
4.2.5. Efecto del EHT sobre la expresión de ARNm de FRK en HUAEC y HUVEC.....	151
4.2.6. Efecto de un anticuerpo frente a FRK sobre la adhesión de leucocitos mononucleares humanos a HUAEC estimuladas con EHT....	153
4.2.7. Efecto de un inhibidor de NFκB, ERK1/2 y p38 MAPK sobre la expresión de FRK y la adhesión de leucocitos mononucleares humanos inducida por el EHT en HUAEC.....	154
4.2.8 Efecto de un inhibidor de XO, NADPH oxidasa y SOD sobre la expresión de FRK y la adhesión de leucocitos mononucleares humanos inducida por el EHT en HUAEC.....	155
4.2.9. Efecto del silenciamiento de TNFα sobre la expresión de FRK y la acumulación de leucocitos mononucleares a HUAEC inducida por EHT.....	157
4.2.10. Expresión del receptor de FRK (CX ₃ CR1) en monocitos y linfocitos circulantes de individuos sanos no fumadores y pacientes con EPOC.....	158
5. <u>DISCUSIÓN</u>.....	160
5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ECA FRENTE A LA QUIMASA MASTOCITARIA EN LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA INDUCIDA POR ANG-I.....	161

5.2. PAPEL DE FRK EN LA INFLAMACIÓN VASCULAR CAUSADA POR EL HUMO DE TABACO.....	166
6. <u>CONCLUSIONES</u>.....	176
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....	179

INDICE DE ABREVIATURAS

<i>Siglas</i>	<i>Significado</i>
Ang-I	Angiotensina I
Ang-II	Angiotensina II
ARNi	ARN de interferencia
AT ₁	Receptor 1 de Angiotensina II
AT ₂	Receptor 2 de Angiotensina II
bFGF	<i>basic Fibroblast Grow Factor</i> (Factor de crecimiento básico de fibroblastos)
CMP48/80	Compuesto 48/80
DAB	Diamino Benzamida
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DDPI	Dipeptidil Peptidasa I
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina I
EGF	Epidermal Grow Factor
EHT	Extracto acuoso de Humo de Tabaco
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
ET	Endotelina
FBS	Suero Fetal Bovino.
FE	Ficoeritrina.
FEV	<i>Forced Expiratory Volume</i>
FGF	<i>Fibroblast Grow Factor</i> (Factor de crecimiento de fibroblastos)
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
fMLP	N-formil- metionil-leucil-fenilalanina
FRK	fractalquina
FVC	<i>Forced Vital Capacity</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution.</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HUAEC	Células Endoteliales de Arteria de cordón Umbilical Humano
HUVEC	Células Endoteliales de Vena de cordón Umbilical Humano
i.p.	Intraperitoneal.
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
Igs	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
INF- γ	Interferón- γ
KO	<i>Knock Out</i>
LBA	Lavado Bronquioalveolar
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas.
LPS	Lipopolisacárido bacteriano

LTs	Leucotrienos
MAC	Moléculas de adhesión celular
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MMP	Metaloproteinasas
MCP	Quimasas mastocitarias
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NFκB	Factor Nuclear κB
NK	<i>Natural killers</i>
NO	Oxido Nítrico
p.o.	Vía oral.
PAF	Factor Activador de plaquetas
PBMC	Mononucleares de sangre periférica.
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solución tampón de fosfatos)
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa.
PFA	Paraformaldehído
PLPT	Proteína de Tránsito de Fosfolípidos
PMN	Polimorfonucleares
RT	Retrotranscriptasa inversa.
SEPAR	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
SOD	Superóxido Dismutasa.
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA.
TGF	<i>Transforming Grow Factor</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
Vrbc	Velocidad de eritrocitos
Vwbc	Velocidad de rodamiento
XO	Xantina Oxidasa

<u>TABLAS:</u>	Pág.
<i>INTRODUCCIÓN</i>	
Tabla 1: Clasificación de las quimasas de los mamíferos.....	47
Tabla 2: Principales funciones de la quimasa.....	52
Tabla 3: Principales efectos de la activación de los receptores AT ₁ y AT ₂	55
Tabla 4: Factores regulados por la Ang-II que contribuyen a la inflamación tisular	57
<i>MÉTODOS</i>	
Tabla 5: Reactivos y volúmenes utilizados en la RT para la determinación de la expresión de los receptores AT _{1A} y AT _{1B} en el músculo cremáster de ratón.....	106
Tabla 6: Reactivos y volúmenes utilizados en la PCR para la determinación de la expresión de los receptores AT _{1A} y AT _{1B} en el músculo cremáster de ratón.....	107
Tabla 7: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la PCR de AT _{1A} y AT _{1B}	109
Tabla 8: Programa de amplificación por PCR.....	109
Tabla 9: Referencias de los genes utilizados para la PCR cuantitativa de AT _{1A} y AT _{1B}	110
Tabla 10: Referencias de los genes utilizados para la PCR cuantitativa de FRK.....	127
Tabla 11: Referencias de los genes utilizados en el ensayo de PCR	128
<i>RESULTADOS</i>	
Tabla 12: Parámetros leucocitarios hemodinámicos y sistémicos.....	134

FIGURAS:

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Metabolismo del angiotensinógeno para la generación de las hormonas peptídicas del sistema renina-angiotensina..... 44

Figura 2. Síntesis de Ang-II a partir de Ang-I por acción de las quimasas mastocitarias..... 48

Figura 3. Producción y activación de la quimasa mastocitaria..... 50

Figura 4. Acciones de la Ang-II y los factores que intervienen en la presión arterial..... 56

Figura 5. Papel de la Ang-II en la respuesta inflamatoria..... 58

Figura 6. Inducción de estrés oxidativo y arteriosclerosis a través del receptor AT₁ de Ang-II 61

Figura 7. Alteraciones morfofuncionales responsables de la limitación del flujo espiratorio en pacientes con EPOC avanzada..... 63

Figura 8. Activación de los macrófagos del tracto respiratorio por el humo del cigarro (y otros agentes irritantes) 66

Figura 9. Isoformas de La Nox₂ y Nox₄. 68

Figura 10. Papel del estrés oxidativo en la fisiopatología de la EPOC..... 70

Figura 11. Estructura de la FRK 77

Figura 12. La formación de la fracción soluble de la FRK resulta de la acción enzimática ejercida por la enzima convertidora de TNF α 77

Figura 13: Modelo clásico y vías de la FRK en la cascada de adhesión..... 80

MÉTODOS

Figura 14: Foto representativa del equipo de microscopía intravital..... 91

Figura 15: Esquema de la Cámara de Flujo paralelo (Flow Chamber)..... 113

RESULTADOS

Figura 16: Efecto de la Ang-II, Ang-I y el CMP48/80 sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) en la microcirculación cremastérica..... 133

Figura 17: Efecto del losartán, enalapril y quimostatina sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) inducido por Ang-I en la microcirculación cremastérica.....	135
Figura 18: Efecto del losartán, enalapril, quimostatina y mepiramina sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) inducido por CMP48/80 en la microcirculación cremastérica.....	136
Figura 19: Efecto de la Ang-I, CMP48/80 y Ang-I+CMP48/80 sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), la adhesión leucocitaria venular (B), la velocidad de rodamiento leucocitario (C) y la desgranulación mastocitaria (D) en la microcirculación del cremastérica.	137
Figura 20: Fotomicrografías representativas que muestran inmunolocalización de la ECA y la mMCP-4 en la microvasculatura del cremáster del ratón.....	138
Figura 21: Expresión de ARNm de los receptores AT _{1A} y AT _{1B} en la microcirculación cremastérica del ratón.	139
Figura 22: Efecto de captopril, quimostatina y combinación de captopril y quimostatina en la generación de Ang-II a partir de Ang-I en homogenado de cremáster de ratón.	140
Figura 23: Efecto del losartán, enalapril, quimostatina y de la combinación de enalapril + quimostatina sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) inducido por Ang-I+CMP48/80 en la microcirculación cremastérica.	142
Figura 24: Efecto del cromolín sobre la desgranulación mastocitaria en la microcirculación del cremáster del ratón.	143
Figura 25: Efecto del cromolín sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), la adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) inducida por Ang-I+CMP48/80 en la microcirculación cremastérica de ratones salvajes y de ratones deficientes en mastocitos..	144
Figura 26: Fotomicrografías representativas que muestran la inmunolocalización de la ECA y de la mMCP-4 en la microvasculatura cremastérica de ratones deficientes en mastocitos (E).....	145
Figura 27: Efecto de la exposición a humo de tabaco sobre la inflamación pulmonar en ratones salvajes (CX ₃ CR1 ^{+/+}) y ratones deficientes en el receptor de FRK (CX ₃ CR1 ^{-/-}).	147
Figura 28: Efecto de la exposición a humo de tabaco sobre las interacciones leucocito-endotelio en la microcirculación cremastérica de ratones salvajes (CX ₃ CR1 ^{+/+}) y ratones deficientes en el receptor de FRK (CX ₃ CR1 ^{-/-}).....	148

Figura 29: Fotomicrografías representativas del efecto del humo de tabaco sobre la expresión de FRK en la microvasculatura cremastérica de ratones salvajes.....	149
Figura 30: Efecto del EHT (0,1, 0,3, 1 y 3%) y de TNF α (20 ng/ml) sobre la expresión de ARNm de FRK en HUAEC (A y C) y HUVEC (B y D).....	150
Figura 31: Efecto del EHT sobre la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC.....	152
Figura 32: Efecto de EHT 1% sobre la expresión de FRK en HUAEC.....	152
Figura 33: Efecto de un anticuerpo neutralizante de FRK, un anticuerpo neutralizante de VCAM-1 o la coadministración de ambos, sobre la adhesión de leucocitos mononucleares humanos a HUAEC y HUVEC, inducida por EHT.....	154
Figura 34: Efecto de un inhibidor de NFRKB, ERK1/2 y p38 MAPK sobre la expresión de FRK y la adhesión de leucocitos mononucleares a HUAEC inducida por EHT.	155
Figura 35: Efecto de alopurinol, apocinina y SOD sobre la expresión de FRK y la acumulación de leucocitos mononucleares a HUAEC inducida por EHT.....	157
Figura 36: Efecto del silenciamiento de TNF α en la expresión de FRK y la adhesión de leucocitos mononucleares en HUAEC estimuladas con EHT 1%.....	158
Figura 37: Expresión del receptor de FRK (CX ₃ CR1) en monocitos circulantes de individuos sanos no fumadores y pacientes con EPOC.....	159
DISCUSIÓN	
Figura 38: Diagrama esquemático ilustrando los mecanismos redox propuestos implicados en la expresión de FRK inducida por EHT.....	173

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PROCESO INFLAMATORIO

1.1.1. Consideraciones generales.

La inflamación (del latín *inflammatio*: encender, hacer fuego) es una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generada por los denominados “agentes inflamatorios”. La respuesta inflamatoria ocurre en tejidos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado. Se considera por tanto un mecanismo de inmunidad innata, estereotipado, en contraste con la reacción inmune adaptativa, específica para cada tipo de agente infeccioso.

La respuesta inflamatoria se inicia, normalmente, con un daño tisular causado por el agresor: el organismo reconoce el daño y pone en marcha los mecanismos responsables de la localización y eliminación del agente extraño. Después se activan tanto mediadores solubles como componentes celulares de la inflamación que producen la amplificación de la respuesta inflamatoria. En condiciones normales, el agente agresor es destruido, se inhiben los mediadores inflamatorios, y se regenera el tejido dañado recuperando sus funciones fisiológicas. En algunas circunstancias, la inflamación puede que no cumpla adecuadamente su función de defensa o, que los mecanismos reguladores se alteren, dando lugar a una respuesta inflamatoria exagerada que agrava el daño tisular.

Según la persistencia del daño, la sintomatología clínica y la naturaleza de la reacción inflamatoria (relacionada ésta con la subclase de leucocito que predomina), se hace una distinción entre inflamación aguda e inflamación crónica:

- La inflamación aguda es más violenta; se caracteriza por acumulación de plasma en el tejido afectado, estimulación intravascular de

plaquetas y presencia de neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares, PMNs).

- La inflamación crónica supone un equilibrio entre los mecanismos de agresión y de defensa. Puede aparecer desde el comienzo de la enfermedad, o ser una secuela de la inflamación aguda cuando la respuesta inflamatoria es incapaz de eliminar al agente causal. Se distingue por el predominio de células mononucleares (sobre todo macrófagos) y también linfocitos, células plasmáticas y otras.

1.1.2. Mediadores de la respuesta inflamatoria.

Los fenómenos básicos de la inflamación son regulados por los productos conocidos como mediadores de la inflamación, que son mediadores solubles o moleculares. Estos mediadores químicos, son de naturaleza diversa:

- *Plasmático*: el sistema del complemento, las cininas, el sistema de la coagulación y el fibrinolítico. Estos mediadores son los que desencadenan la reacción inflamatoria al reconocer toxinas y células dañadas y también contribuyen a amplificar la respuesta inflamatoria.
- *Celular (mediadores preformados y almacenados en gránulos citoplásmicos o rápidamente sintetizados ante un estímulo inflamatorio)*: los péptidos y las aminas (histamina y neuropéptidos), el óxido nítrico (NO), citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF α), mediadores lipídicos como las prostaglandinas (PGs), los leucotrienos (LTs), el factor activador de plaquetas (PAF) o las quimiocinas, entre otros. Son, en parte, responsables de la amplificación de la respuesta inflamatoria.
- *Derivados de los microorganismos invasores*: péptidos formilados quimiotácticos y endotoxinas. Entre ellos encontramos a las moléculas vasoactivas, que actúan directamente en la vasculatura para

aumentar la permeabilidad vascular, y los factores quimiotácticos, que promueven la extravasación de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio.

Además, en el proceso inflamatorio participan diversos componentes o mediadores celulares como:

- *Leucocitos* (*neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos/macrófagos*): estas células además de liberar mediadores inflamatorios, son capaces de adherirse al endotelio, de migrar a su través y, en general, de fagocitar y destruir a los agentes patógenos.
- *Plaquetas*: liberan mediadores inflamatorios, activan a los leucocitos y participan en la resolución de la inflamación.
- *Células endoteliales*: sintetizan y liberan numerosos mediadores inflamatorios e interactúan con los leucocitos en la infiltración leucocitaria.

Una característica común a leucocitos, plaquetas y células endoteliales, además de su capacidad para liberar mediadores inflamatorios, es que presentan en su superficie las llamadas moléculas de adhesión celular (MAC), que facilitan las interacciones entre estos tres tipos celulares (Celi et al., 1997; Ley et al., 2007).

1.1.3. Regulación de la infiltración leucocitaria.

En el proceso inflamatorio, y también en condiciones fisiológicas como parte de su función de vigilancia, los leucocitos deben abandonar el torrente circulatorio, mediante un proceso que se denomina infiltración leucocitaria. Los leucocitos deben atravesar la monocapa de células endoteliales que recubre la pared interna de los vasos sanguíneos, para pasar al espacio extravascular, donde realizarán sus funciones biológicas. Las MAC y los factores quimiotácticos son los principales mediadores en

el proceso de infiltración leucocitaria, ya que, actuando directamente sobre los leucocitos, provocan la interacción de éstos con el endotelio vascular:

- *MAC*: son glicoproteínas que se expresan en la superficie de las células. Promueven la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales o entre los leucocitos y la matriz extracelular.
- *Factores quimiotácticos*: son mediadores químicos solubles generados localmente en los sitios de daño tisular. Actúan como señales que atraen más leucocitos circulantes al foco inflamado y controlan la expresión de algunas MAC. Los factores quimiotácticos se pueden clasificar como:
 - Agentes quimiotácticos clásicos o inespecíficos, que atraen a todos los leucocitos en general: fragmentos C5a y C3a del complemento, moléculas lipídicas (LTB₄, PAF), péptidos bacterianos formilados (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina o fMLP), etc.
 - Quimiocinas, que atraen determinados subtipos de leucocitos de forma selectiva: por ejemplo, la interleucina-8 (IL-8), la *monocyte chemoattractant/chemotactic protein-1* (MCP-1), la eotaxina, etc.

Otros mediadores solubles que intervienen en la infiltración leucocitaria son las citocinas. Entre ellas destacan las citocinas proinflamatorias como el TNF α o la IL-1, que promueven la migración leucocitaria sin ser propiamente quimiotácticas, es decir, no actúan directamente sobre los leucocitos sino que hacen a las células endoteliales más adhesivas para éstos o inducen en diversos tipos celulares la liberación de otros mediadores (Celi et al., 1997; Ley et al., 2007; Wagner & Roth, 2000).

1.1.4. Etapas de la infiltración leucocitaria

El proceso de infiltración leucocitaria, que abarca, pues, desde el contacto inicial de los leucocitos con el endotelio hasta que alcanzan el espacio extracelular, se ha simplificado en un modelo que predice tres etapas sucesivas y coordinadas: rodamiento, adhesión y migración¹. Se define como una cascada puesto que la interrupción de la etapa inicial impide las siguientes (Ley et al., 2007; Springer, 1994).

1.1.4.1. Adhesión primaria y rodamiento.

En primer lugar, las células endoteliales activadas aumentan su adherencia a los leucocitos (“los reconocen”). Este contacto inicial no es aleatorio, sino que constituye la adhesión primaria o laxa que enlentece el tránsito leucocitario y, aumenta la posibilidad de una interacción más estrecha de los leucocitos con el endotelio. Esta fase se denomina rodamiento leucocitario y es el paso limitante para las siguientes fases.

El proceso se inicia con la liberación de mediadores generados por el tejido dañado (histamina, trombina, $TNF\alpha$, IL-1, etc.) que producen una rápida activación de las células endoteliales. En consecuencia, (1) se producen sustancias quimiotácticas, y (2) aumenta la expresión de determinadas MAC; principalmente las selectinas, que determinan la interacción inicial leucocito-endotelio y el rodamiento leucocitario. Dicha interacción es reversible. Si no se desencadenan los mecanismos de adhesión firme, los leucocitos volverán al torrente circulatorio (Celi et al., 1997; Kubes & Kanwar, 1994; Ley et al., 2007; McEver 2010; von Andrian et al., 1991).

¹ Algunos autores consideran alguna de éstas como dos etapas y no como una sola, de modo que el proceso de infiltración leucocitaria puede extenderse a cuatro etapas: (1) interacción inicial leucocito-endotelio (“*tethering*”), (2) rodamiento de leucocitos sobre el endotelio (“*rolling*”), (3) activación leucocitaria y adhesión firme al endotelio y (4) migración transendotelial (Reinhardt and Kubes, 1998); e incluso a cinco etapas si la (3) se subdivide a su vez en otras dos.

1.1.4.2. Activación y adhesión firme.

Si el estímulo persiste, se produce la activación de los leucocitos en rodamiento, fenómeno aparentemente muy rápido que da lugar a la detención de los mismos de manera estable, produciéndose su adhesión firme al endotelio vascular.

Median en esta etapa:

- Las sustancias originadas en el foco inflamatorio que, por la menor velocidad de los leucocitos en rodamiento, pueden interaccionar con ellos y activarlos: pueden ser exógenas (fMLP) o endógenas (C5a, PAF, LTB₄ y otros agentes quimiotácticos como las quimiocinas).
- MAC: integrinas de la membrana leucocitaria (como algunas β_2) cuya expresión aumenta como consecuencia de la activación, o sufren un cambio conformacional a estado activo (como integrinas α_4 o α_L) y sus ligandos, las inmunoglobulinas (Igs) (Ley et al., 2007; Springer, 1994; Sullivan et al., 2004).

1.1.4.3. Migración y quimiotaxis.

Finalmente, se inicia la migración a través del endotelio y la quimiotaxis, que es el movimiento unidireccional de los leucocitos a través del tejido hacia el foco de inflamación, atraídos por concentraciones crecientes de agentes quimiotácticos originados en el foco.

Este proceso lo regulan:

- MAC, tanto integrinas como Igs, como otras descritas recientemente (Ley et al 2007) que hacen posible la diapédesis.
- Los agentes quimiotácticos y determinadas quimiocinas, que forman un gradiente quimiotáctico que dirige la diapédesis y la migración a

través del tejido (Luscinskas & Lawler, 1994; Ley et al 2007; Sallusto & Baggiolini 2008).

1.2. LA ARTERIOSCLEROSIS

1.2.1. Consideraciones generales.

La arteriosclerosis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares en Europa, Estados Unidos y, de forma creciente, en Asia (Franco et al., 2011; Ross, 1993).

Anteriormente se consideraba que el proceso de aterogénesis consistía básicamente en una acumulación pasiva de lípidos en el interior de las paredes arteriales (Libby et al., 2002; Paoletti et al., 2004; Ross, 1993); esto pudo deberse a que los altos niveles plasmáticos de colesterol, en particular los asociados a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), constituyen uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la arteriosclerosis (Glass & Witztum, 2001; Ross, 1993). Sin embargo, los avances científicos más recientes atribuyen un papel central a la inflamación, la cual participa en todas las fases de la lesión arterosclerótica: en su inicio, en su progresión y en las complicaciones trombóticas de la enfermedad (Libby et al., 2002). Se acepta en general la hipótesis postulada por Rusell Ross en 1977, que considera que la aterosclerosis es el resultado de la respuesta a una disfunción endotelial (Ross 1993). Se trata de un complejo proceso inflamatorio y proliferativo crónico de naturaleza multifactorial, en el que intervienen multitud de tipos celulares (Paoletti et al., 2004).

Histológicamente, la arteriosclerosis se caracteriza por una lesión focal (la placa aterosclerótica) en arterias de mediano y gran calibre, constituida por un cúmulo de células, material extracelular y lípidos en el espacio comprendido entre el endotelio (íntima) y las células de la

musculatura lisa vascular (media). Las células inflamatorias predominantes en las lesiones ateroscleróticas, son los macrófagos y linfocitos T, mientras que los neutrófilos están notablemente ausentes (Glass & Witztum, 2001; Ross, 1993).

1.2.2. Bases del proceso de aterogénesis.

1.2.2.1. Disfunción endotelial

Se han formulado diversas hipótesis en relación al origen de la arteriosclerosis. De acuerdo con la más aceptada, la “hipótesis de la respuesta al daño”, la lesión aterosclerótica puede ser iniciada por diferentes agentes y destaca que el primer paso de la arteriosclerosis consiste en la disfunción o pérdida de la función protectora normal del endotelio (Ross, 1993). La disfunción endotelial se define como un estado proinflamatorio y protrombótico del endotelio que provoca la adhesión y subsiguiente migración leucocitaria a través del endotelio que da lugar a posteriores alteraciones vasomotoras (Landmesser et al., 2004).

La disfunción endotelial está frecuentemente asociada a la exposición a factores de riesgo cardiovascular, como hipertensión, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, una elevación de proteínas glicosiladas en sangre (característica de pacientes diabéticos), la presencia de agentes químicos oxidantes en sangre (frecuente en fumadores) o Infecciones crónicas por microorganismos como herpesvirus, *Chlamydia pneumoniae* y otros.

Las alteraciones en el flujo sanguíneo también parecen ser críticas en la determinación de los lugares arteriales propensos al desarrollo de la lesión aterosclerótica. Así, ésta se localiza preferentemente en regiones sometidas a fluctuaciones hemodinámicas (bifurcaciones, ramificaciones,

curvaturas) como ocurre en las arterias carótidas y coronarias (Libby et al., 2002; Osterud & Bjorklid, 2003; Ross, 1993).

1.2.2.2. Inicio y evolución de la lesión aterosclerótica

Inicio de la lesión

Los cambios más tempranos que tienen lugar en el endotelio, y que preceden a la formación de la placa aterosclerótica, suponen el comienzo de la acumulación de leucocitos mononucleares (monocitos, sobre todo, y linfocitos T) y de lípidos en el espacio subendotelial (Ross, 1993).

Los cambios que ocurren en el endotelio aterosclerótico son los siguientes:

Aumento de permeabilidad:

- El endotelio se hace más permeable a las LDL, excediéndose la capacidad del sistema de transporte inverso de colesterol que lo devuelve al torrente circulatorio. Este aumento de permeabilidad está mediado por sustancias como NO, prostaciclina, angiotensina-II (Ang-II) y endotelina.
- Las LDL extravasadas son oxidadas en el espacio subendotelial por las células endoteliales, las células de la musculatura lisa y los macrófagos tisulares (Ross, 1993).

Adhesión y migración de leucocitos en el espacio subendotelial:

- Las LDL oxidadas (LDL_{ox}), activan el endotelio para expresar MAC tipo E-selectina, P-selectina, ICAM-1 o VCAM-1, que atrapan a leucocitos mononucleares circulantes, especialmente monocitos, y actúan como receptores para las MAC como L-selectina, integrinas o PECAM-1, que están presentes en ellos.

- Las MAC actúan con diversas moléculas quimiotácticas, MCP-1 entre otras, generadas por las células endoteliales, las células de la musculatura lisa y los monocitos. Así, los leucocitos atraviesan el endotelio por diapédesis y colonizarán la íntima subendotelial. La infiltración de leucocitos se da especialmente en aquellas regiones arteriales de flujo sanguíneo turbulento, que muestran elevada expresión de las MAC endoteliales y leucocitarias.
- En el espacio subendotelial los monocitos se transforman en macrófagos que secretan más agentes quimiotácticos específicos, y atraen mayor número de monocitos circulantes (Libby et al., 2002; Ross, 1993; Reape & Groot 1999).

Formación de la estría grasa

La lesión aterosclerótica precoz o estría grasa es una lesión inflamatoria, que consiste en un cúmulo de macrófagos cargados de lípidos (células espumosas) y linfocitos T en la íntima, que se acompaña de proliferación de las células musculares lisas (Ross, 1993). Los macrófagos, captando las LDLox a través de sus receptores scavenger (receptores “basurero”) (Glass and Witztum, 2001), se convierten en células espumosas por mediación de diversos factores como *granulocyte/macrophage colony stimulation factor* (GM-CSF), TNF α o IL-1 (Libby et al., 2002; Ross, 1993). Su formación incluye los siguientes pasos:

- *La inflamación supone un aumento de macrófagos y linfocitos T que se infiltran y se multiplican dentro de la lesión.* Lo que se traduce en la activación y proliferación de más leucocitos mononucleares, y la amplificación de la respuesta inflamatoria (Ross, 1993).
- *Adherencia y agregación plaquetaria:* El endotelio estimulado por las LDLox se vuelve procoagulante debido a:

- Disminución de la secreción de NO y de prostaciclina, lo que provoca adherencia y agregación plaquetaria,
- Síntesis de factor tisular (FT), responsable de la coagulación,
- Inhibición de la síntesis del activador de plasminógeno tisular (tPA) y estimulación de la síntesis de del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), lo que altera la fibrinólisis.

También contribuyen a este proceso: los linfocitos T activados, mediante la expresión de MAC como la L-selectina e integrinas, los monocitos/macrófagos y las células de la musculatura lisa, ya que también sintetizan FT (Libby et al., 2002; Ross, 1999).

Acumulación de células de la musculatura lisa en el espacio subendotelial:

Las células endoteliales, los monocitos/macrófagos, las plaquetas y otras células como linfocitos T, células cebadas y las propias células de la musculatura lisa liberan diversas sustancias como citocinas y factores de crecimiento (*platelet-derived growth factor*- PDGF, *transforming growth factor*- TGF) que estimulan la proliferación y migración de estas células de la musculatura lisa desde la media hacia el lumen arterial. La progresiva acumulación de las mismas contribuye la formación de la capa neoíntima. (Libby et al., 2002; Ross, 1993).

La lesión avanzada: placa fibrosa

La progresión de la estría grasa da lugar a la típica lesión neoíntima denominada placa fibrosa, que consta de una cubierta fibrosa que mantiene aislado un núcleo necrótico formado por lípidos, leucocitos, restos celulares y material extracelular. El engrosamiento de la pared arterial puede ser compensado por su dilatación gradual, pero llega un momento en que la compensación no es posible y la lesión se introduce en el lumen, lo que

provoca un progresivo estrechamiento del vaso que puede dar lugar a síntomas isquémicos (Glass & Witztum, 2001; Ross, 1993). Para que se desarrolle la lesión es necesario:

- *Infiltración leucocitaria sostenida:*

Prosigue la infiltración y proliferación de leucocitos en la íntima subendotelial, ampliándose los límites de la lesión. Las enzimas, citocinas y factores de crecimiento liberados por ellos pueden producir un daño mayor y necrosis (Libby et al., 2002; Ross, 1993).

- *Formación del núcleo necrótico:*

El núcleo necrótico es el resultado de:

- Necrosis celular y apoptosis de macrófagos, células endoteliales y de la musculatura lisa.
- Aumento de la actividad proteolítica: los macrófagos y las células de la musculatura lisa liberan enzimas especializadas como metaloproteinasas de la matriz (MMP) y otras que provocan la degradación de las fibras de colágeno que forman la matriz extracelular.
- Acumulación de lípidos (Glass & Witztum, 2001; Libby et al., 2002; Ross, 1993).

- *Formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis):*

En las arterias normales, la tensión parcial del oxígeno en la capa media está regulada por los niveles de oxígeno en la luz arterial y en la luz de los *vasa vasorum*. El aumento de espesor en la pared arterial, debido al crecimiento de la placa de ateroma, provoca una hipoxia en la lesión que induce a un aumento en la expresión de moléculas angiogénicas que inducen la formación de nuevos vasos contribuyendo al crecimiento de la lesión. Esto es un factor de riesgo añadido, pues además de aumentar la inflamación, pueden romperse y provocar hemorragias. La evolución de la lesión aterosclerótica a partir de la capa fibrosa supone una gran

vulnerabilidad a la rotura o ulceración, habitualmente en los sitios más finos, con la posible formación repentina de trombos, lo que causa la mayoría de las complicaciones agudas de la arteriosclerosis como el infarto de miocardio (Glass & Witztum, 2001; Libby et al., 2002; Ross, 1993).

1.3. LOS MASTOCITOS.

1.3.1. Consideraciones generales.

Los mastocitos son las células inflamatorias más conocidas por su papel central en enfermedades alérgicas (Williams & Galli, 2000). Son células efectoras multipotentes que surgen de las células progenitoras hematopoyéticas $CD34^+$ en la médula ósea, circulan como células progenitoras y, finalmente, encuentran su destino en distintos tejidos del cuerpo, donde lentamente se van diferenciando y convirtiendo en mastocitos maduros con gránulos secretores en el citoplasma (Jipo et al., 1997, Galli et al., 2005). Hay evidencias que indican que los cambios en el número de mastocitos así como los cambios que afectan a la distribución celular y a las características fenotípicas, pueden ser controlados por factores de crecimiento. La heterogeneidad de los mastocitos en cuanto a las diferencias en las propiedades bioquímicas y funcionales, puede contribuir a la diversidad de las maneras por las que los mastocitos pueden ser activados, y a su papel en las distintas respuestas fisiológicas, inmunológicas, inflamatorias o cualquier respuesta biológica en la que participen (Metz et al., 2007).

Las células madre que tienen un receptor c-kit tirosina-kinasa en la superficie celular, tienen el potencial para diferenciarse en mastocitos maduros en respuesta al factor de crecimiento de las células madre. Los ratones deficientes en mastocitos surgen por una mutación espontánea en el locus *w*, de tal manera que este receptor está ausente. Las mutaciones en

este locus dan lugar a manchas blancas, anemia macrocítica, deficiencia de mastocitos y esterilidad (Lazarus et al., 2000).

1.3.2. Localización de los mastocitos.

Los mastocitos son componentes normales del tejido conectivo, pero también están presentes en el parénquima. Se encuentran distribuidos ampliamente por los tejidos vascularizados, donde normalmente residen en la proximidad de los vasos sanguíneos, nervios, células musculares, glándulas productoras de mucus y folículos pilosos. Pueden ser especialmente numerosos en sitios anatómicos que están directamente expuestos al medio externo incluyendo la piel, las vías aéreas y el tracto gastrointestinal (Kitamura et al., 1989, Galli et al., 2005, Marone et al., 2005). También son visibles en el epimisio, perimisio y vasos sanguíneos y en menor número en fascículos de fibras musculares. Además también se localizan en la pared arterial formando parte de las células inflamatorias infiltradas y por ello pueden contribuir a la progresión de las lesiones ateroscleróticas (Kelley et al., 2000).

1.3.3. Clasificación de los mastocitos.

Los mastocitos poseen un fenotipo muy heterogéneo, en el que el desarrollo en distintas poblaciones se basa según lo dictado por las señales locales de su entorno, ya que los mastocitos adquieren su fenotipo maduro localmente en aquellos tejidos en los que residirán finalmente (Galli et al., 2005). Al madurar en distintos ambientes pueden mostrar un contenido en triptasas y quimasas muy variado, y estas diferencias son las responsables de que su comportamiento pueda ser diferente y de que se clasifiquen en distintos subtipos. El número y tipo de quimasas y triptasas expresadas también difiere entre mamíferos, especialmente entre roedores y humanos.

En humanos, los mastocitos pueden clasificarse según su contenido enzimático o según su localización.

1. Según su contenido enzimático:

MCc: aquellos que expresan principalmente quimasa y cathepsina G.

MCtc: aquellos que expresan triptasa y quimasa y que son más abundantes en la dermis de la piel. Los mastocitos que expresan triptasa, son principalmente aquellos que se encuentran en las mucosas húmedas (Caughey et al., 2007).

2. Según su localización:

MMC: Los mastocitos localizados en la lámina propia o en el epitelio de las superficies mucosas que se conocen como mastocitos de las mucosas.

CTMC: Los mastocitos del tejido conectivo de la piel y el músculo esquelético

1.3.4. Activación y liberación del contenido de los gránulos.

Los mastocitos poseen la capacidad de segregar diversos productos biológicamente activos tras la exposición a una variedad de estímulos tanto inmunológicos como no inmunológicos. Dependiendo del mecanismo de activación particular y de la fuerza del estímulo, se liberan distintos tipos de mediadores y citoquinas.

El mecanismo de activación de mastocitos más estudiado es el inducido mediante activación de los receptores FcεRI por unión de la Ig-E, y en los ratones también mediante la unión de las Ig-G₁. Aunque este es el mecanismo más común, existen otras formas mediante las cuales estas células pueden ser activadas:

- Directamente por patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos y también por los productos solubles derivados de estos patógenos.

- Por péptidos endógenos y exógenos, citoquinas, y otros mediadores proinflamatorios (Metz et al., 2007).

Una vez activados, los mastocitos pueden liberar diversos mediadores que pueden resumirse en 3 clases:

- Mediadores preformados que están almacenados en los gránulos citoplasmáticos: como histamina, proteoglicanos y proteasas como las quimasas, triptasas y carbopeptidasas A.
- Mediadores lipídicos sintetizados de novo: metabolitos del ácido araquidónico por acción de la lipooxigenasa (leucotrienos) o por acción de la ciclooxigenasa (prostanoides).
- Citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento (TGF- β , el factor de crecimiento para fibroblastos, el TNF α) y mediadores químicos como el NO.

Los mediadores derivados de los mastocitos, como la triptasa, el TNF α y la histamina pueden activar las células endoteliales para que expresen moléculas de adhesión, como P-selectina y VCAM-1 responsables de la acumulación de otras células inflamatorias. Debido a la secreción de TNF α y TGF- β , los mastocitos también son capaces de estimular la producción MCP-1 y por tanto, también pueden inducir la infiltración de monocitos en la placa aterosclerótica (Gordon et al., 2000).

Muchos de estos productos tienen actividad proinflamatoria y proapoptótica (quimasas y TNF α) y por tanto pueden promover cambios en los tejidos afectados por respuestas inflamatorias, incluyendo la degradación de estructuras locales o el remodelado tisular, que van asociados con cambios en la función de los órganos afectados. Pero otros productos pueden tener actividad anti-inflamatoria, como IL-10 y TGF- β que también son expresados y liberados por los mastocitos (Metz et al., 2007, Lindstedt et al., 2004).

1.3.4.1. Peptidasas mastocitarias

La mayoría de proteínas almacenadas en los gránulos mastocitarios son endopeptidasas y se liberan por exocitosis. Las principales enzimas presentes son triptasas y quimasas, que son serín proteasas de la familia de la tripsina. Pero a pesar de pertenecer a la misma familia difieren en cuanto a formación, actividad y patrones de expresión. Los tipos, cantidades y propiedades de estas serín proteasas varía dependiendo del subtipo de mastocito, el tejido en el que maduren y también del mamífero de origen (Caughey et al., 2007).

A diferencia de la histamina, las peptidasas permanecen unidas a la heparina después de su secreción y así conservan parte de su actividad en el líquido extracelular (Gordon et al., 2000).

Triptasas.

Las triptasas se han descrito solo en mamíferos, en los cuales existe mucha variabilidad en cuanto a su formación y actividad, sobretodo en humanos que tienen 4 locus de expresión de triptasa mastocitaria además de varios pseudogenes (Caughey et al., 2007, Pallaoro et al., 1999, Caughey et al., 2000). Se clasifican principalmente en 2 grupos, las que se anclan a la membrana y las solubles. El único grupo conocido que se ancla a la membrana es la del grupo de las γ -triptasas. Las solubles incluyen las triptasas α y β en humanos y la proteasas mastocitarias de ratón 6 y 7 (MCP-7, MCP-6) de tipo δ (Caughey et al., 2000).

Peptidasas mastocitarias tipo quimotripsina: quimasas y catepsina G.

Los mastocitos sintetizan 2 tipos de enzimas con actividad tipo quimotripsina, que se define por la afinidad de estas enzimas para escindir péptidos y proteínas diana después de un aminoácido aromático, especialmente tirosina y fenilalanina. Estas enzimas son las quimasas y la

catepsina G. Las quimasas se expresan de forma selectiva por los mastocitos. Aunque existen evidencias de que también las células de músculo liso pueden expresar las quimasas, solamente los mastocitos parecen capaces de almacenarla en los gránulos mastocitarios (Caughey et al., 2007).

1.3.5. Mastocitos y aterosclerosis.

En la aterosclerosis se sabe que los mastocitos participan en el establecimiento y la progresión de la enfermedad. En tejidos crónicamente inflamados como las placas ateroscleróticas, los mastocitos se someten probablemente a una desgranulación lenta, en la que los componentes de los gránulos se van secretando en microvesículas y están continuamente liberando pequeñas cantidades de quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento y mediadores lipídicos proinflamatorios, que se sintetizan de novo (Dvorak et al., 1997). De esta forma los mastocitos participan en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis. El TNF α contribuye a la ruptura de la placa aumentando la producción y la activación de metaloproteinasas (MMP), inhibiendo la proliferación de células musculares e induciendo apoptosis tanto en las células de músculo liso como en las endoteliales (Lindstedt et al., 2004). Además la infiltración y la activación mastocitaria también se han relacionado con la erosión y la ruptura de la placa en síndromes coronarios agudos (Guo et al., 2009).

1.3.5.1. Activación de los mastocitos en la placa aterosclerótica.

Se ha observado que los mastocitos en las placas ateroscleróticas están rodeados de gránulos exocitados, que se llaman “restos de gránulos” y que en las lesiones ateroscleróticas avanzadas, la fracción de los mastocitos desgranulados aumenta como signo de inflamación (Kaartinen

et al., 1994). De forma similar a otras zonas de inflamación crónica como en las articulaciones reumáticas, los mastocitos de la placa son activados por los macrófagos y linfocitos T presentes en esa zona. Además, las placas ateroscleróticas contienen diferentes sustancias que pueden activar a los mastocitos, como inmuno-complejos y la anafilotoxina C5a derivada del complemento. Ya que los mastocitos presentes en la placa poseen el receptor para C5a, es probable que la activación del complemento los active también (Oksjoki et al., 2007). Adicionalmente, se ha observado que las lipoproteínas también pueden activar a los mastocitos. Por tanto, ya que la aterogénesis es una enfermedad muy dependiente de lipoproteínas, esta forma de activación mastocitaria, si está presente en las lesiones humanas, sería muy relevante en aterosclerosis (Kelley et al., 2006).

1.3.5.2. Localización de los mastocitos en la placa.

La influencia de los mastocitos activados en las placas ateroscleróticas está restringida al entorno más inmediato y por tanto la localización de estas células en la placa es de importancia crítica. En las placas ateroscleróticas más avanzadas, existen dos regiones donde pueden situarse, siempre cercanos a las células endoteliales. Una localización superficial al lado de endotelio luminal o una localización más profunda cerca de las células endoteliales de nuevos microvasos.

La íntima arterial es un tejido peculiar porque carece de circulación capilar. Es el principal motivo por el que los mastocitos no se encuentran en la profundidad de esta capa. A diferencia de la íntima, la capa más externa de la pared arterial, la adventicia, está llena de pequeños vasos, los *vasa vasorum*, y está rodeada de multitud de mastocitos (Laine et al, 1999). Estas células son frecuentes en las placas de ateroma inestables y en el espacio subendotelial de ateromas erosionados. De hecho, hay mayor

número de mastocitos desgranulados en la adventicia de las arterias coronarias que poseen placas de ateroma rotas.

Con mayor número de mastocitos y su posterior activación, el resultado es que distintos mediadores, como histamina, citoquinas y proteasas entran en juego en el entorno aterosclerótico. La histamina una vez liberada, puede desencadenar espasmo coronario provocando un infarto de miocardio. Además niveles elevados de histamina se han detectado en pacientes con síndrome coronario agudo, y en arterias coronarias de pacientes que fallecieron por muerte súbita (Laine et al., 1999).

1.3.5.3. Mastocitos y su papel en la acumulación de colesterol

También se ha demostrado la importancia de los mastocitos en la aterosclerosis, por su papel en la acumulación de colesterol ya que facilitan la conversión de los macrófagos en células espumosas. De hecho, la unión de la heparina de los mastocitos a las LDL supone la formación de un gran complejo insoluble que puede ser fagocitado por los macrófagos, permitiendo la acumulación de colesterol. Los mastocitos que contienen triptasas y quimasas están presentes tanto en las lesiones ateroscleróticas tempranas como tardías. Las triptasas son importantes alterando el primer paso del transporte reverso del colesterol, promoviendo así la acumulación de colesterol durante la aterogénesis. La quimasa ha demostrado alterar la función anti-aterogénica de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLPT) impidiendo la formación dependiente de PLPT de partículas de pre- β -HDL a partir de HDL (Lee et al., 2003). Además, la quimasa puede alterar el efecto estabilizador de las células musculares lisas en las placas ateroscleróticas vulnerables (Reid et al., 2007) ya que induce apoptosis de las células de músculo liso en las arterias coronarias.

1.3.6. Mastocitos y otras patologías cardiovasculares.

Los mastocitos juegan un papel importante en la hipersensibilidad inmediata y reacciones inflamatorias, en la cicatrización de heridas y en la defensa del huésped. Se sabe que los mastocitos proliferan en el corazón y están implicados en isquemia miocárdica, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca y anafilaxis (Reid et al., 2007).

Las células mastocitarias han sido implicadas en respuestas inflamatorias crónicas y en diversas enfermedades caracterizadas por la existencia de un proceso inflamatorio asociado. Muchas de estas condiciones se asocian con cambios en el número o el fenotipo de las poblaciones de mastocitos en el órgano afectado o en el sitio anatómico, y en muchos de estos estados existe una evidencia morfológica clara de varias formas de activación de los mastocitos. Además, muchos productos derivados de éstos tienen efectos que pueden influenciar de forma significativa a la supervivencia, la proliferación, el fenotipo, o la función de muchos otros tipos celulares que participan en la inflamación crónica y el remodelado tisular (Metz et al., 2007).

En la aterosclerosis, los mastocitos facilitan la acumulación de colesterol y la desestabilización de la placa mediante la liberación de $\text{TNF}\alpha$, quimasas y triptasas. En insuficiencia cardíaca, contribuyen a la disfunción ventricular promoviendo la apoptosis de los miocitos y la proliferación de los fibroblastos. Además la quimasa y la triptasa también contribuyen a la fibrosis característica de las miocardiopatías, mientras que el $\text{TNF}\alpha$ induce la activación de las MMP, dando lugar al remodelado cardíaco.

Ya que los mastocitos se encuentran en el corazón, en las arterias coronarias y en las placas ateroscleróticas, también están implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares crónicas, en las que el número de mastocitos está aumentado.

1.4. LA ANGIOTENSINA-II (Ang-II)

1.4.1. Consideraciones generales

La Ang-II, constituye el principal péptido del Sistema Renina Angiotensina (SRA). Desde hace tiempo se conoce su papel central en la regulación del tono vascular y la presión arterial, del equilibrio hidroelectrolítico y, más recientemente, se sabe de su capacidad de controlar el crecimiento celular; pero también hay cada vez más evidencias de que puede inducir respuesta inflamatoria en la pared vascular, respuesta que está implicada en la patogenia de muchas enfermedades como hipertensión, enfermedades cardiovasculares (infarto de miocardio y arteriosclerosis) y enfermedades renales. En particular, se sabe que la Ang-II promueve importantes alteraciones estructurales y funcionales a través de la activación de complejas reacciones celulares, especialmente en las células endoteliales y las células de la musculatura lisa vascular (Alcazar et al., 2003; Liu and Cheng, 2005; Volpe et al., 2002; Watanabe et al., 2005; Piqueras et al., 2000; Alvarez & Sanz, 2001; Alvarez et al., 2004; Naim Abu Nabah et al., 2004; Mateo et al., 2006, Mateo et al., 2007). Así, la Ang-II presenta una importante actividad moduladora del proceso aterogénico, induciendo la producción de ERO, citocinas inflamatorias y quimiocinas y aumento de expresión de distintas MAC (Brasier et al., 2002; Ruiz-Ortega et al., 2001a; Piqueras et al., 2000; Alvarez & Sanz, 2001; Alvarez et al., 2004; Naim Abu Nabah et al., 2004; Mateo et al., 2006, Mateo et al., 2007).

1.4.2. Vías de síntesis de la Ang-II.

La Ang-II, es el péptido efector del SRA, siendo ésta su principal vía de síntesis, mediante la acción de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA). Alternativamente, la Ang-II se puede generar por otras rutas enzimáticas diferentes a la ECA (rutas “no-ECA”), en diferentes tejidos del organismo (Berry et al., 2001; Liu & Cheng, 2005; Volpe et al., 2002). En una de estas rutas la Ang-II es generada directamente a partir de angiotensinógeno, gracias a la acción del tPA, la catepsina G y la tonina (Liu & Cheng, 2005). Además puede sintetizarse a partir de la Ang-I, con la participación de la quimasa (muy importante en la generación local de Ang-II en corazón, riñón y vasos) y la catepsina G (Alcazar et al., 2003; Berry et al., 2001). Estas rutas no-ECA son funcionalmente importantes a nivel vascular y se estima que la Ang-II formada por rutas no-ECA representa un 40% del total de la Ang-II humana, lo que sugiere que no se puede lograr la completa supresión del SRA únicamente a través de la inhibición de la ECA (Liu & Cheng, 2005) (figura 4).

La respuesta inflamatoria vascular parece estar más relacionada con la Ang-II generada localmente que con la circulante (Liu & Cheng, 2005), y muchos componentes enzimáticos tisulares implicados en la síntesis de Ang-II, están presentes en la placa aterosclerótica (Brasier et al., 2002).

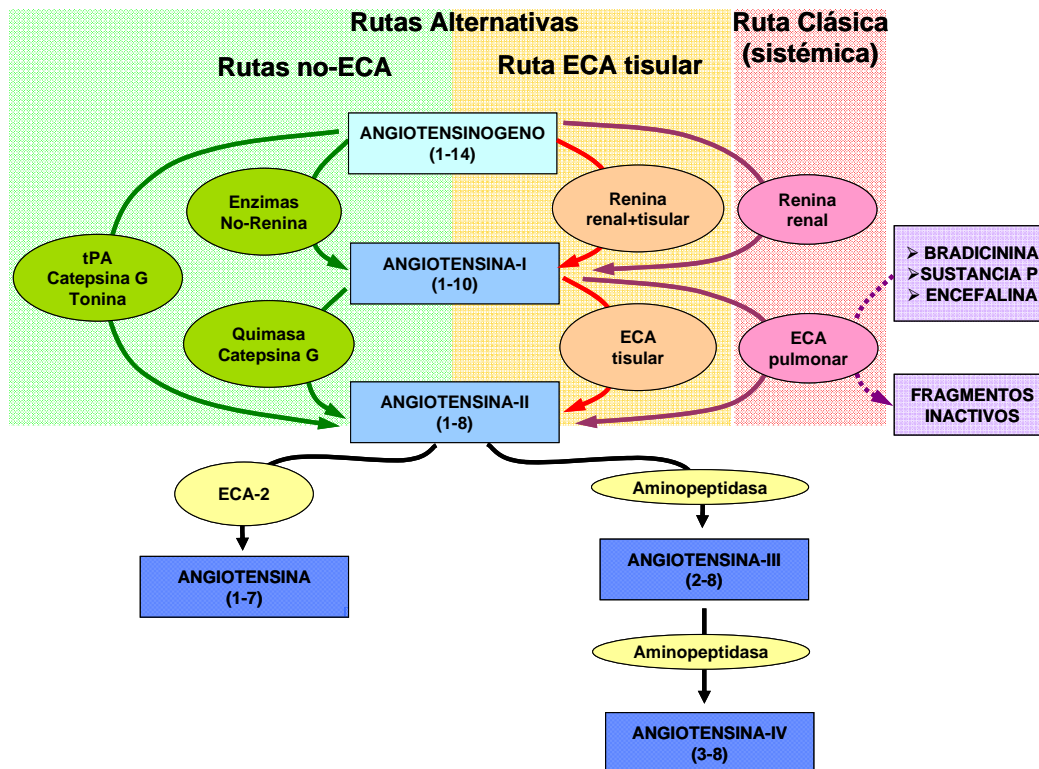


Figura 1. Metabolismo del angiotensinógeno para la generación de las hormonas peptídicas del sistema renina-angiotensina

1.4.2.1. Vías de síntesis de Ang-II dependientes de la ECA.

El Sistema Renina Angiotensina (SRA).

Tradicionalmente, el SRA ha sido descrito como un sistema endocrino en que la renina, enzima proteolítica producida y almacenada en el aparato yuxttaglomerular del riñón, actúa sobre el angiotensinógeno, una globulina α_2 circulante de origen hepático, y lo escinde en el enlace Leu-Val para formar la angiotensina-I (Ang-I), decapeptido inactivo. A su vez, la Ang-I es transformada por la acción de la enzima convertidora de la Ang-I (ECA), enzima muy ampliamente distribuida pero producida mayoritariamente en el endotelio pulmonar, que cliva los dos aminoácidos (His-Leu) del extremo C-terminal para formar la Ang-II.

La Ang-II, no es sólo una hormona endocrina que se produce y actúa en la circulación, sino que también se forma en muchos tejidos como

cerebro, riñón, corazón y vasos sanguíneos, lo cual sugiere su función como hormona paracrina y autocrina (de Gasparo et al., 2000). Además del componente sistémico, el SRA tiene otro componente tisular (local), por tanto, son capaces de producir Ang-II a nivel local (Berry et al., 2001; Liu & Cheng, 2005; Volpe et al., 2002). La ECA tisular está presente en órganos importantes como corazón, cerebro, vasos sanguíneos, corteza suprarrenal y riñón y útero (Berry et al., 2001). Los vasos sanguíneos son el lugar de mayor producción de Ang-II; en ellos se han encontrado todos los componentes del SRA, excepto la renina, por lo que la producción local de Ang-II en el intersticio vascular parece depender de la renina circulante (Berry et al., 2001).

La Enzima Convertidora de Angiotensina-I (ECA).

La ECA es una dipeptidil carboxipeptidasa cuyo peso molecular es de 90-100 kD o de 140-160 kD, dependiendo de su localización. Se clasifica como una M2 de la familia de las metaloproteasas y contiene un ión de zinc en su estructura (Kramkowski et al., 2006). Además es idéntica a la cininasa II y por tanto actúa como una cininasa no específica que tiene varios sustratos diferentes a Ang-II como la bradicinina, la encefalina, la sustancia P y otros (Volpe et al., 2002). La ECA también convierte Ang (1-9) en Ang (1-7).

Se localiza principalmente en plasma y en la superficie de las células endoteliales, siendo una enzima que predomina en el espacio intravascular. Es la vía predominante en la formación de Ang-II (Kramkowski et al., 2006). Por consiguiente, la activación del SRA, parece jugar un papel crucial en el desarrollo de la lesión vascular asociada a aterosclerosis, infarto de miocardio y otras enfermedades renales.

1.4.2.2. Vías de síntesis de Ang-II independientes de ECA.

La administración de inhibidores de la ECA ha ayudado a descubrir la existencia de otras vías alternativas formadoras de Ang-II, conocidas como vías ECA-independientes. Algunas de las enzimas implicadas son la tonina, la kalicreína, la catepsina G, la catepsina D y la quimasa localizada en los gránulos de los mastocitos (Akasu, 1998; Li, 2004). En experimentos realizados con aortas aisladas, se observó que la enzima generadora de Ang-II sensible a la quimostatina (CAGE) generaba Ang-II a partir de Ang-I, sin embargo su papel fisiológico todavía está por estudiar (Kramkowski et al., 2006).

La Quimasa mastocitaria.

La primera descripción bioquímica de la existencia de vías alternativas de formación de Ang-II independientes de la ECA fue publicado por Boucher y cols. (Boucher et al., 1977), para la tonina en las glándulas salivares de la rata, seguida de la tripsina, calicreína y catepsina G, enzimas tipo quimotripsina detectadas en la piel de ratas y humanos descubiertas (Arakawa et al. 1976; Arakawa & Maruta, 1980; Arakawa et al., 1980b; Tonnesen et al, 1982; Wintroub et al, 1984). Varias enzimas podían generar Ang-II a partir del angiotensinógeno o de la Ang-I. La demostración biológica de las vías alternativas de formación de Ang-II la llevó a cabo Cornish y cols. (1979) en hámster y por Trachte & Lefer (1979) en el músculo papilar del gato. En otros estudios biológicos, como en arterias procedentes de perros, corazón de hamster, etc, las enzimas responsables de la formación de Ang-II independiente de la ECA no pudieron ser identificadas. Por tanto, el significado fisiopatológico de las vías alternativas de formación de Ang-II permanecía incierto hasta que un grupo de investigadores encontró que la mayoría de Ang-II formada en el

corazón in vitro era debida a la quimasa mastocitaria, la cuál resultó ser la serín-proteasa más potente y específica jamás descrita (Urata et al., 1990a; Urata et al., 1990b). La quimasa se distingue claramente de otras enzimas formadoras de Ang-II por la sensibilidad y especificidad de sustrato. Aunque muchos animales poseen quimasa, las funciones bioquímicas y fisiológicas de éstas varían entre especies. Por ejemplo, la quimasa de rata, que se identificó en los mastocitos peritoneales, degrada la Ang-II en lugar de formarla. La heterogeneidad de estas quimasas hace que elegir un modelo animal para su estudio sea complicado (Akasu et al., 1998).

La Quimasa mastocitaria. Clasificación.

La quimasa mastocitaria es una serín proteasa tipo quimotripsina secretada por los mastocitos. Las quimasas de los mamíferos se subdividen en dos grupos, quimasas α y quimasas β , dependiendo de su estructura y de la especificidad de sustrato (tabla 1). Ambos subgrupos de quimasas son capaces de generar Ang-II pero solamente las β -quimasas son capaces de degradar este péptido (figura 2) (Caughey et al., 2000).

α -quimasas	Quimasa humana, quimasa de mono, la quimasa del perro, la quimasa-2 de oveja y la quimasa-2 de hámster.
β -quimasas	Quimasas mastocitarias 1 y 2 de rata, quimasas 1, 2, 4, 5 y 9 de ratón

Tabla 1: Clasificación de las quimasas de los mamíferos.

Las quimasas de tipo α , que aparentemente son el producto de un único gen, se expresan en la mayoría de los mamíferos, aunque la cantidad expresada depende de la especie. Este subtipo de quimasas actúa clivando el enlace Phe⁸-Hys⁹ de la Ang-I generando Ang-II.

Las quimasas de tipo β , que son el producto de varios genes, parecen haberse perdido en la evolución humana, ya que en humanos se expresan exclusivamente α -quimasas, mientras que en los roedores además de las α -quimasas, también se expresan quimasas- β (Wolters et al., 2000, Doggrell et al, 2004). Este subtipo de quimasas, al igual que las de tipo α , pueden producir Ang-II a partir de Ang-I hidrolizando preferentemente el enlace peptídico de la Ang-I, pero además, también pueden degradar la Ang-II clivando el enlace Tyr⁴-Ile⁵ de ésta generando así péptidos inactivos (Doggrell et al, 2004, Dellitalia et al, 2002). Las β -quimasas son las proteasas mastocitarias de rata (rMCP)-1 y -2 que degradan a la Ang-II y como mínimo se han detectado 5 proteasas mastocitarias de ratón (mMCP-1, -2, -4, -5, -9), éstas en cambio, pueden formar o degradar Ang-II.

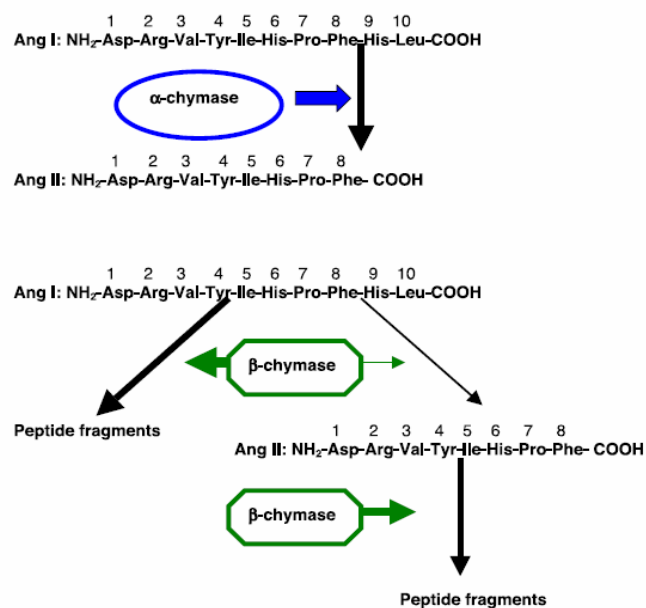


Figura 2. Síntesis de Ang-II a partir de Ang-I por acción de las quimasas mastocitarias.

Localización.

La quimasa mastocitaria se encuentra en los vasos sanguíneos, corazón y otros muchos tejidos, pero no en plasma. En los vasos sanguíneos, la quimasa se localiza preferentemente en la adventicia,

mientras que la ECA se localiza predominantemente en el endotelio vascular. La implicación de esta localización es que la Ang-I intravascular es más accesible a la ECA que a la quimasa. (Borland et al, 2005, Doggrell et al, 2004).

Síntesis de la quimasa y desgranulación.

A diferencia de la ECA y la ECA2 que son carboxipeptidasas, la quimasa es una endopeptidasa que se libera de los mastocitos en un complejo de heparina y proteoglicano, pero antes de su secreción, la quimasa tiene que ser activada intracelularmente. Los dipéptidos precursores de las quimasas, las pro-quimasas, son similares a la cathepsina G, al grupo B de las granzimas y al de las elastasas de los neutrofilos, la mayoría de las cuales pueden ser activadas por una dipeptidil-peptidasa I (DDPI). Esta enzima es particularmente abundante en los mastocitos (Doggrell et al, 2004).

La quimasa se sintetiza como proquimasa inactiva y para su activación en los gránulos secretores es necesaria la participación de la DPPI. La DPPI es una tiol-proteinasa que actúa a un pH óptimo de 6, ya que su función como enzima activadora de la proquimasa la tiene que llevar a cabo dentro de los gránulos mastocitarios en los que el pH es de 5,5. El pH óptimo para la quimasa se encuentra entre 7 y 9, por tanto permanece inactiva dentro de los gránulos de los mastocitos y muestra actividad enzimática inmediatamente después de su liberación en la matriz extracelular (pH 7,4) cuando los mastocitos se han activado por un daño o inflamación. Por tanto, parece que la quimasa no posee actividad enzimática en tejidos normales y su actividad se observa únicamente en los tejidos dañados (Takai et al, 2004) (figura 3).

Una vez liberada, la quimasa se rodea del líquido extracelular que contiene inhibidores endógenos de la quimasa. Sin embargo, hay

evidencias que sugieren que mientras la quimasa esté unida a los proteoglicanos de heparina, pero no cuando se libera de ellos, es resistente a la inhibición por los inhibidores de proteasas endógenos e incluso es capaz de degradar a su inhibidor, la α_1 -antitripsina (Doggrell et al., 2004, Takai et al, 2004). A pesar de ello, en la sangre existen potentes inhibidores de la quimasa con lo que la actividad de ésta es rápidamente inhibida. Por tanto, la quimasa solamente tiene actividad enzimática cuando se genera localmente en los tejidos (Takai et al, 2004) (figura 3).

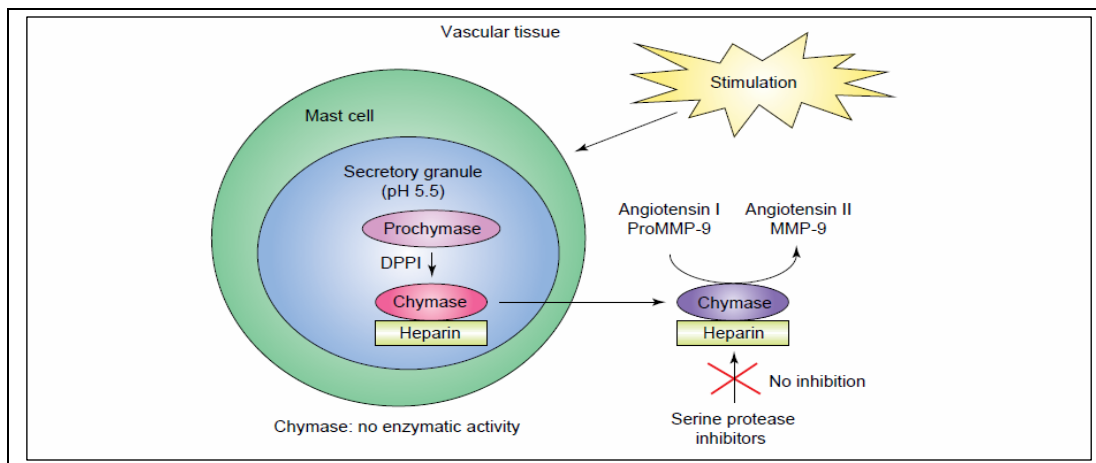


Figura 3. Producción y activación de la quimasa mastocitaria.

Funciones de la quimasa.

La quimasa se conoce como una enzima convertidora de Ang-II porque fue la primera reacción que se observó que catalizaba. Sin embargo, la quimasa realiza muchas más funciones, que podrían ser inhibidas por los inhibidores selectivos de ésta.

- Las quimasas contribuyen a la degradación de la matriz extracelular directamente por clivaje de proteínas como la fibronectina y colágenos no helicoidales y parecen ser capaces de activar las MMP in situ en las placas ateroscleróticas (Kovanen et al., 2007), ya que la activación de MMP va acoplada a la desgranulación mastocitaria, específicamente a la liberación de quimasas (Caughey et al., 2007, Doggrell et al., 2004).

- La quimasa también es importante en la liberación y activación del TGF- β_1 . El TGF- β_1 tiene un importante papel en las lesiones ateroscleróticas ya que regula la diferenciación, la migración y la proliferación de las células musculares, y la síntesis y secreción de la matriz extracelular (Takai et al, 2004).
- Las quimasas también han demostrado poseer actividad proapoptótica induciendo apoptosis de las células musculares in vitro, mediante degradación proteolítica de componentes pericelulares de la matriz, con la consecuente alteración de la adhesión celular (Caughey et al., 2007).
- Puede ejercer acciones sobre las lipoproteínas implicadas en aterogénesis. Las proteasas de los mastocitos participan en la degradación de las lipoproteínas de baja densidad LDL y de las lipoproteínas HDL3, con lo que los macrófagos cargados de colesterol son incapaces de mediar el flujo de colesterol en las células espumosas (Doggrell et al, 2004).
- Otras funciones: como la síntesis de endotelinas de 31 aa, que se forman por clivaje de grandes endotelinas en el enlace Tyr-Gly y la activación de IL-1 β , que es una citocina proinflamatoria que interviene en la proliferación vascular, posee propiedades proangiogénicas y participa también en el desarrollo de la aterosclerosis (Takai et al, 2004, Doggrell et al, 2004).
- Puede activar por proteólisis al factor celular madre para el desarrollo y proliferación de los mastocitos. Por tanto puede jugar un papel importante en la acumulación de mastocitos que expresen quimasa, mediante la activación de este factor. De hecho, en modelos experimentales, la inhibición de la quimasa disminuye no solo la actividad quimasa, sino también la acumulación mastocitaria (Inoue et al., 2009).

FUNCIONES DE LA QUIMASA
Activación del TGF- β 1
Proteólisis de LDL
Síntesis de endotelinas de 31 aa
Desarrollo de aterosclerosis
Proliferación vascular
Propiedades proangiogénicas
Degradación de la matriz extracelular
Permeabilidad vascular y remodelado tisular por proteólisis selectiva de proteínas de la matriz y activación de MMPs

Tabla 2: Principales funciones de la quimasa mastocitaria.

Quimasa y aterosclerosis.

En la aterosclerosis el número de mastocitos activados está aumentado en las lesiones ateroscleróticas, donde tanto la actividad quimasa como los niveles de mRNA se encuentran también incrementados (Miyazaki & Takai, 2001).

Estudios previos han demostrado que la quimasa liberada por los mastocitos puede contribuir a la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica ya que aumenta los niveles de Ang-II en los tejidos vasculares independientemente de la ECA. Además puede activar algunas MMPs, el factor de crecimiento TGF- β , inducir apoptosis en las células musculares de la vasculatura lisa y degradar componentes de la matriz de la capa fibrosa (Guo et al., 2009). La elevada actividad quimasa junto con aumento en los niveles de expresión de Ang-II, MMP-1, MMP-9, TGF- β 1 e IL-1 en las placas, podría implicar a la quimasa y a las citoquinas relacionadas, en el desarrollo y la progresión de la placa aterosclerótica y, por tanto, aumentaría la relevancia de la quimasa como posible diana terapéutica en la prevención de la desestabilización de la placa (Guo et al., 2009).

La quimasa, por tanto, puede promover el desarrollo y agravar la vulnerabilidad de la placa actuando a distintos niveles:

- Aumentando la concentración de Ang-II en tejido vascular por conversión de Ang-I a Ang-II.
- Activando el TGF- β_1 en las placas, que aumenta los niveles de Ang-II por la estimulación de formación de la renina.
- Convirtiendo el precursor IL-1 β en IL-1 activa.
- Activando MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 en las placas. Estas MMP degradan la matriz extracelular e inducen apoptosis de las células de la musculatura lisa vascular.
- Degradando apolipoproteína AI e inhibiendo el flujo de colesterol a las células espumosas.
- Provocando la proteólisis directa de laminina, resilina y colágeno, componentes de la matriz que forma la placa.

1.4.3. Caracterización de los receptores de Ang-II

La Ang-II media sus efectos al interaccionar con receptores específicos localizados en la membrana plasmática de sus células diana (de Gasparo et al., 2000; Liu et al., 2007). Los dos tipos principales, a los cuales se deben la mayoría de dichos efectos, son los receptores de tipo 1 (AT₁) y los receptores de tipo 2 (AT₂). Los AT₁ son los receptores a los que se atribuye la mayoría de las acciones clásicas y bien conocidas de esta hormona peptídica (vasoconstricción, liberación de aldosterona, sed, hipertrofia cardíaca, inflamación, etc.) (Ardaillou, 1998; Berry et al., 2001; Unger et al., 1996; Piqueras et al., 2000, Alvarez et al., 2004, Mateo et al., 2006, Mateo et al; 2007). También se ha descrito la existencia de receptores diferentes a los anteriores como el AT₃, el AT₄ y otros, que no han sido completamente caracterizados; algunos de ellos son específicos para los

metabolitos activos de Ang-II (Ardaillou, 1998; Berry et al., 2001; Unger et al., 1996).

1.4.3.1. Caracterización de los receptores AT₁

Los receptores AT₁ están distribuidos abundantemente y en numerosos tejidos adultos: sistema cardiovascular, riñones, glándulas suprarrenales, hígado, cerebro y pulmones (Kim & Iwao, 2000; Warnholtz et al., 1999). Dentro del sistema cardiovascular, en los vasos, los receptores AT₁ se encuentran principalmente en las células de la musculatura lisa vascular, en las células endoteliales y en la adventicia. En el corazón, están presentes en los miocitos y en los fibroblastos (Berry et al., 2001; Brasier et al., 2002). También se expresan en los leucocitos circulantes, principalmente en monocitos y PMNs (Ito et al., 2001; Shimada & Yazaki, 1978).

En roedores, el receptor AT₁ incluye dos subtipos funcionalmente diferentes: AT_{1A} y AT_{1B} (Ardaillou, 1998; Berry et al., 2001;). La expresión de los receptores AT₁ está regulada de forma precisa por la propia Ang-II y otras moléculas; además se produce aumento de estos receptores en hipertrofia cardíaca y en infarto de miocardio (Matsubara, 1998).

1.4.3.2. Caracterización de los receptores AT₂

En el caso de los receptores AT₂, su expresión es muy marcada y amplia sólo en los tejidos fetales en desarrollo, ya que ésta decrece rápidamente tras el nacimiento (Henrion et al., 2001). Así, en el adulto, los receptores AT₂ se expresan en niveles relativamente bajos y quedan restringidos a algunos territorios vasculares. También se han encontrado en corazón, útero, ovario, páncreas y, sobre todo, en médula adrenal y ciertos núcleos del cerebro (Ardaillou, 1998; Berry et al., 2001; Henrion et al., 2001; Warnholtz et al., 1999). La distribución del receptor AT₂ en el

territorio vascular todavía no está bien caracterizada: no es homogénea sino que está sujeta a cambios según la edad, la especie, el tipo de vaso y determinadas condiciones como el embarazo o situaciones patológicas (hipertensión, entre otras) (Henrion et al., 2001).

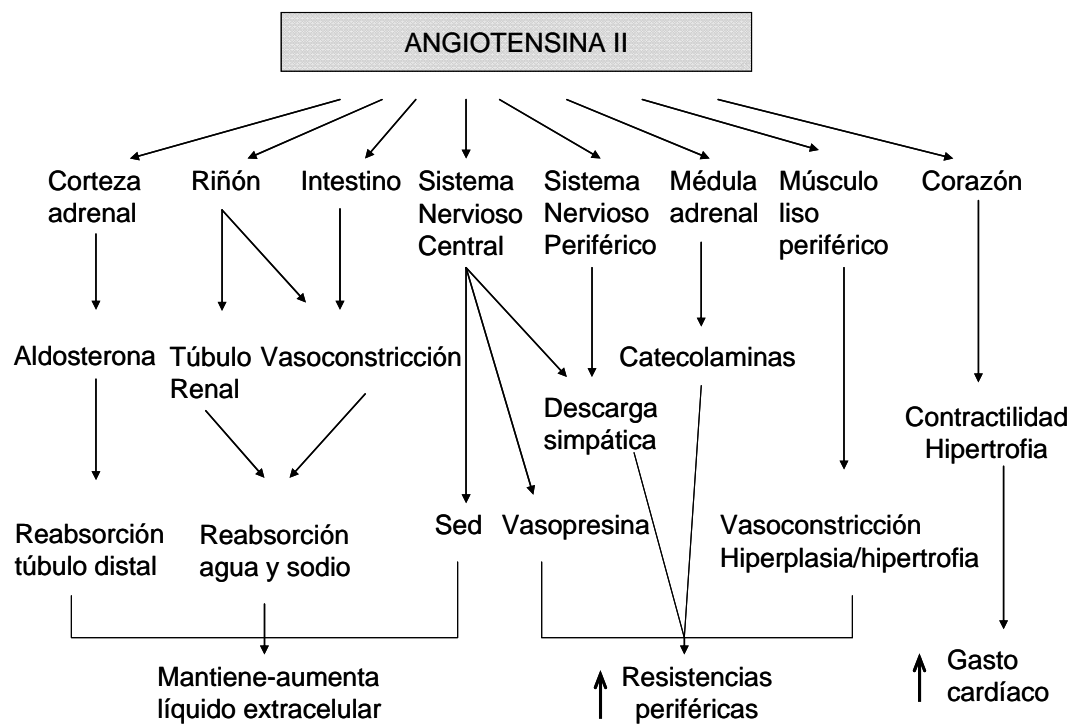
A diferencia del AT₁, el receptor AT₂ no parece presentar subtipos distintos en roedores.

Existen multitud de factores que afectan a la expresión de los receptores AT₂. Esta expresión se ve aumentada con la insulina, algunos factores de crecimiento y determinadas citocinas. Existe un gran aumento en la expresión de los receptores AT₂ en situaciones de reparación de daños tisulares, por ejemplo, postinfarto de miocardio (de Gasparo et al., 2000; Henrion et al., 2001; Watanabe et al., 2005).

1.4.4. Efectos mediados por los receptores AT₁ y AT₂

Las acciones de la Ang-II se deben a su acción directa sobre sus receptores, a su acción indirecta a través de la liberación de otros factores, o bien, a su interacción con cascadas de señalización intracelular de otras sustancias (agentes vasoactivos, factores de crecimiento y citocinas). Las respuestas finales son el resultado de la combinación de los efectos mediados por la interacción con sus receptores AT₁ y AT₂ (Berry et al., 2001). Estos efectos se recogen en la tabla 3.

AT ₁	AT ₂
Vasoconstricción	Vasodilatación
Proliferación celular	Inhibición del crecimiento celular
Hipertrofia celular	Apoptosis
Expansión de la matriz vascular	Síntesis de colágeno
Antinatriuresis	Natriuresis
Producción de ERO	Acciones antioxidantes
Liberación de ET	Producción de NO
Peroxidación lipídica	
Expresión de MAC	
Secreción de quimiocinas	
Secreción de aldosterona	
Secreción de vasopresina	
Sed	

Tabla 3. Principales efectos de la activación de los receptores AT₁ y AT₂. (ET: endotelina).**Figura 4.** Acciones de la Ang-II y los factores que intervienen en la presión arterial

1.4.5. Papel de la Ang-II en la inflamación.

1.4.5.1. La Ang-II en la respuesta inflamatoria

Las acciones de la Ang-II como hormona vasoactiva, así como sus funciones como factor de crecimiento capaz de inducir hipertrofia, fibrosis y apoptosis han sido bien estudiadas. Más recientemente, se ha ampliado esta visión al considerarse su papel como mediador proinflamatorio. Todas estas acciones convierten a la Ang-II en una auténtica citocina que participa en patologías cardiovasculares y renales (hipertrofia y remodelado cardíaco, insuficiencia cardíaca, arteriosclerosis, glomerulosclerosis) y también en otras enfermedades relacionadas con la inflamación (diabetes mellitus, cáncer, alteraciones endocrinas, alteraciones psiquiátricas, enfermedad de Alzheimer, enfermedades gastrointestinales, psoriasis, etc) (Alcazar et al., 2003; Iqbal et al., 2005; Vinall et al., 2000).

Citocinas	IL-1, IL-6, TNF α
Factores de crecimiento	TGF- β , PDGF, EGF, IGF-1, bFGF, CTGF, VEGF
Quimiocinas	MCP-1, RANTES, IL-8, MCP-3, MIP-1 α , IP-10
MAC	VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, E-selectina
Agentes vasoactivos	ET-1, NO
Lípidos	PGs, PAF

Tabla 4. Factores regulados por la Ang-II que contribuyen a la inflamación tisular.

La respuesta inflamatoria a un agente agresor consiste en una reacción de los vasos sanguíneos que conduce a la acumulación de fluido y leucocitos. Aunque su objetivo sea la reparación total del tejido dañado, muchas veces los propios mecanismos inflamatorios pueden conducir a la cicatrización del tejido con aumento de la matriz extracelular y fibrosis tisular, lo que se traduce en la disfunción crónica del tejido. Así, universalmente, esta respuesta incluye tres pasos sucesivos: (1) aumento de permeabilidad vascular, (2) infiltración leucocitaria y (3) remodelado tisular. Los estudios de los últimos años nos muestran claras evidencias de que la Ang-II interviene en cada uno de estos pasos (Alcazar et al., 2003; Liu & Cheng, 2005). Además, la Ang-II regula y modula la proliferación de las células inflamatorias (Ruiz-Ortega et al., 2001b). Los factores regulados por el péptido, y que contribuyen a la inflamación tisular, se recogen en la tabla 4.

1.4.5.2. Acciones de la Ang-II en la respuesta inflamatoria: Ang-II e infiltración leucocitaria

La Ang-II participa activamente en la respuesta inflamatoria, como refleja la figura 4, en:

El aumento de la permeabilidad vascular al inicio de la respuesta inflamatoria. Estos efectos parecen mediados a través de la interacción de Ang-II con su receptor AT_1 .

La infiltración de células inflamatorias en los distintos tejidos. La Ang-II promueve la acumulación y migración de leucocitos a través del endotelio directamente, por activar las células inflamatorias, e indirectamente, por aumentar la expresión de los mediadores proinflamatorios. Además, las propias células inflamatorias activadas por Ang-II activan, a su vez, a los componentes del SRA e incrementan la generación local de Ang-II, con lo que se da la perpetuación de los fenómenos inflamatorios.

La restitución y remodelado de los tejidos dañados durante la inflamación. La Ang-II tiene, entre otros, un importante papel en la proliferación e hipertrofia de células residentes e infiltrantes, mediado principalmente por factores de crecimiento autocrinos y paracrinos (PDGF, VEGF, TGF- β , *basic fibroblast growth factor* o bFGF y *connective tissue growth factor* o CTGF, entre otros).

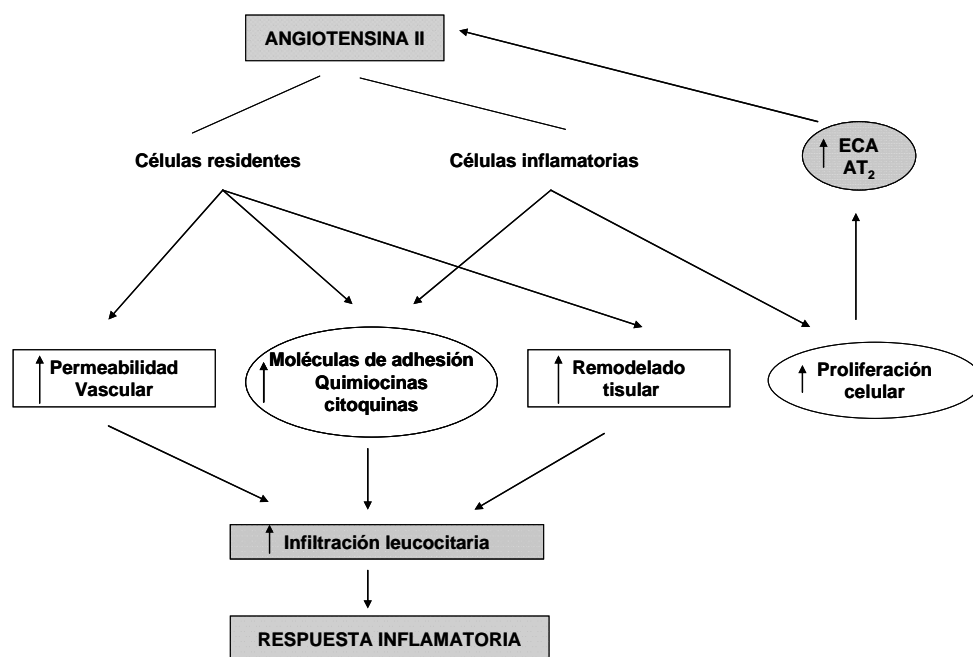


Figura 5. Papel de la Ang-II en la respuesta inflamatoria

La Ang-II ejerce las siguientes acciones:

- *Moléculas de adhesión*: la Ang-II aumenta, bien directa o indirectamente, la expresión de la P- y la E-selectina y de las Igs ICAM-1 y VCAM-1 y por tanto, la Ang-II induce la adhesión de leucocitos al endotelio vascular (Grafe et al 1997; Tummala et al; 1999; Piqueras et al; 2000; Alvarez et al; 2004).
- *Quimiocinas*: la Ang-II aumenta la producción de las quimiocinas, y por tanto participa también en la quimiotaxis y migración de las células inflamatorias hacia los tejidos (Naim Abu Nabah et al., 2004; Mateo et al., 2006; Nabah et al., 2007; Mateo et al., 2007).
 - *Citocinas*: algunas citocinas producidas en respuesta a la Ang-II son la IL-6, el TNF α y la IL-1 (Ruiz-Ortega et al., 2001b; Mateo et al., 2007). La Ang-II favorece la infiltración leucocitaria a través de citocinas inflamatorias (Mateo et al., 2007).

Nuestro grupo de investigación demostró que la Ang-II posee acción proinflamatoria in vivo a nivel agudo (1 hora) a dosis subvasoconstrictoras y fisiológicas. Dicha acción proinflamatoria está mediada principalmente por su interacción con los receptores AT₁ y es totalmente dependiente del rápido aumento de expresión de P-selectina endotelial (Piqueras et al., 2000). En un trabajo posterior llevado a cabo también por nuestro grupo de investigación, se vio que Ang-II provocaba una potente respuesta inflamatoria a nivel venular y arteriolar a las 4 h de su administración. Este hecho indica la aparición de disfunción endotelial, e implica a la Ang-II directamente en el inicio de la lesión aterosclerótica (Alvarez et al., 2004).

1.4.6. La Ang-II en el daño vascular y en la arteriosclerosis.

Como sabemos, el daño vascular arterial que conduce a la arteriosclerosis puede considerarse un fenómeno inflamatorio. Se está empezando a dilucidar cómo la Ang-II contribuye a este proceso patológico. Diversos estudios confirman el importante papel del péptido como modulador directo a lo largo de la arteriosclerosis, tanto en los inicios como en la progresión de ésta (Brasier et al., 2002; Ruiz-Ortega et al., 2001b).

Se sabe que en el daño vascular existe activación del SRA y que el uso de IECA en modelos de daño vascular previene el desarrollo de arteriosclerosis. Al principio este beneficio se atribuía fundamentalmente a la reducción en la presión arterial o a una menor oxidación de las LDL pero datos recientes sugieren que puede deberse además, a un bloqueo de las acciones que la Ang-II ejerce sobre las células a nivel vascular (Mervaala et al., 1999). De hecho, más allá de los efectos hemodinámicos y renales, la Ang-II es un mediador local que actúa directamente en las células endoteliales y las células de la musculatura lisa vascular (Henrion et al., 2001).

Las acciones proaterogénicas de la Ang-II se solapan unas con otras y están presentes, como decíamos, en cada uno de los estadios de la enfermedad; se relacionan con:

- La formación de ERO y la oxidación de las LDL,
- La disfunción endotelial y la inflamación,
- Diversos procesos como crecimiento, apoptosis, degradación de la matriz extracelular y trombosis (Grote et al., 2004; Lesauskaite et al., 2003).

La figura 6 sintetiza cómo, principalmente a través de los receptores AT₁, la Ang-II puede promover estrés oxidativo y contribuir a la formación de la placa aterosclerótica, la disfunción endotelial y la trombosis .

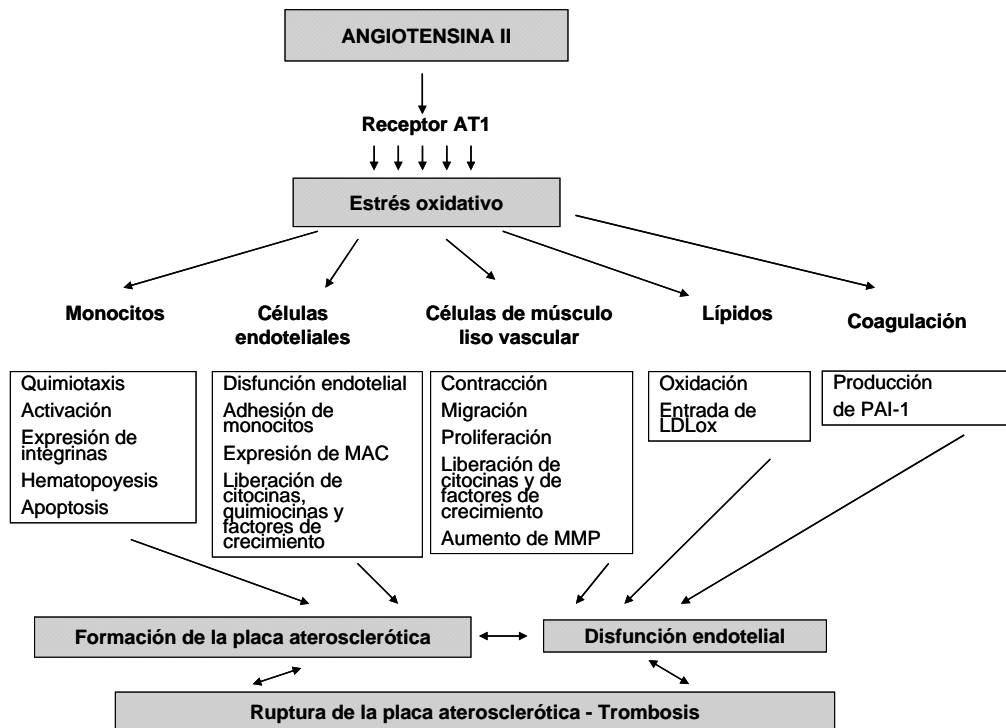


Figura 6. Inducción de estrés oxidativo y arteriosclerosis a través del receptor AT₁ de Ang-II: La activación del receptor AT₁ conduce a la liberación de ERO. El estrés oxidativo, a su vez, está implicado en la activación y atracción de monocitos, lo que implica la producción de quimioquinas como MCP-1. En las células endoteliales, vía O₂⁻, se inducen moléculas de adhesión como P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, esenciales para la adhesión de monocitos. En las células del músculo liso vascular las ERO inducen numerosos procesos biológicos. El receptor AT₁ aumenta la entrada de LDLox. La expresión del PAI-1 aumenta vía receptor AT₁, predisponiendo a un estado procoagulante; los efectos de la Ang-II en el tPA son controvertidos.

1.4.7. Acciones proaterogénicas de la Ang-II

El estrés oxidativo inducido por Ang-II produce la activación de varios factores de transcripción proinflamatorios. Actúa como amplificador de los fenómenos inflamatorios que contribuyen a la formación de la placa aterosclerótica. Una de las principales acciones aterogénicas de la Ang-II se debe a la generación de ERO, especialmente de O₂⁻, en la pared vascular. Esto tiene lugar sobre todo a través de la activación de la NAD(P)H oxidasa del endotelio, de las células de la musculatura lisa vascular y de los fibroblastos de la adventicia, y también a través de la disminución de la

actividad de la NO sintasa endotelial (Lasursen et al., 1997; Alvarez & Sanz, 2001).

La generación de ERO inducida por Ang-II da lugar a la activación de cascadas de señalización intracelular, entre las cuales destaca la del NFκB, que aumenta la expresión de genes proinflamatorios y prooxidantes.

Por otro lado, las ERO producidas en respuesta a Ang-II interaccionan, a su vez, con el NO, que se considera antiinflamatorio y antiaterogénico por su capacidad de “despejar” el O_2^- . En situaciones de estrés oxidativo, el exceso de NO contribuye a la reacción inflamatoria porque genera peroxinitritos (potentes oxidantes). Además, la reacción entre el NO y el O_2^- supone una disminución de la biodisponibilidad de NO y, por lo tanto, de su capacidad para la vasodilatación normal del endotelio. La Ang-II también se asocia a otras fuentes de estrés oxidativo como las LDLox.

En resumen, el aumento de ERO a nivel vascular es un mecanismo central por el cual la Ang-II participa en distintas condiciones clínicas como la arteriosclerosis, induciendo disfunción endotelial y proliferación de las células de la musculatura lisa vascular (Brasier et al., 2002; Grote et al., 2004; Liu & Cheng, 2005).

1.5. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC).

En el transcurso de los últimos años ha aumentado el interés por el estudio de diferentes aspectos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Este avance se debe fundamentalmente al reconocimiento de la importancia de la EPOC como causa de morbilidad, invalidez y mortalidad a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2020, la EPOC se ubicará en el tercer puesto de las causas

más comunes de muerte y en el quinto lugar de las enfermedades discapacitantes (Lopez & Murray, 1998). La SEPAR (Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica), considera la EPOC, un problema de salud por su repercusión social a consecuencia del aumento del tabaquismo, el envejecimiento de la población, la frecuencia de su agudización, y los elevados costes económicos que genera en los sistemas de salud (Izquierdo & Arroyo-Espliguero, 2005).

1.5.1. Alteraciones morfológicas y funcionales de la EPOC.

La EPOC es una enfermedad inflamatoria crónica del tracto respiratorio muy compleja, que involucra diferentes tipos de células inflamatorias y estructurales, las cuales a su vez tienen la capacidad de liberar múltiples mediadores inflamatorios locales y sistémicos. La enfermedad es una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones, principalmente al humo del cigarro (también gases y partículas nocivas) que conduce a una disminución lenta, progresiva e irreversible de la ventilación pulmonar.

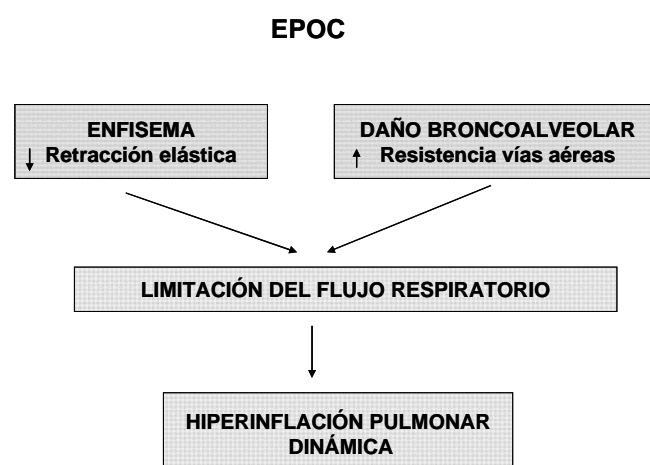


Figura 7. Alteraciones morfofuncionales responsables de la limitación del flujo espiratorio en pacientes con EPOC avanzada.

Las alteraciones morfológicas características de la EPOC avanzada son el daño bronquiolar y el enfisema, que se combinan en distintos grados produciendo limitación crónica del flujo espiratorio. Esta limitación se debe principalmente a: 1) aumento de la resistencia de las vías aéreas pequeñas, secundaria a inflamación de la mucosa, la infiltración celular y fibrosis peribronquiolar y 2) por una disminución de la tracción que normalmente ejerce el tejido elástico pulmonar sobre las paredes de los bronquiólos, debido al enfisema y que es responsable de su colapso espiratorio precoz. La limitación del flujo espiratorio durante respiración tranquila conduce al atrapamiento aéreo o hiperinflación pulmonar dinámica (figura 7) (Manriquez et al., 2004).

Añadido a los efectos pulmonares de la EPOC, la enfermedad afecta de forma significativa a otros órganos y sistemas. Estas alteraciones extrapulmonares asociadas a la patología se denominan efectos sistémicos de la EPOC. Las principales manifestaciones clínicas asociadas son la pérdida de peso, susceptibilidad a patologías cardiovasculares, alteraciones musculares y neurológicas severas. Los mecanismos involucrados en las manifestaciones sistémicas no se han esclarecido, pero se cree que son producto de alteraciones multifuncionales relacionadas a la inflamación, hipoxia tisular y estrés oxidativo, entre otras causas (Agustí et al., 2005).

1.5.2. Mecanismos inflamatorios pulmonares en la EPOC.

La limitación del flujo aéreo en los pacientes EPOC es consecuencia de alteraciones celulares y estructurales de las vías aéreas centrales y periféricas, y del proceso inflamatorio que se extiende hasta el parénquima pulmonar y las arterias pulmonares. Actualmente se acepta que fumar puede activar una reacción inflamatoria en todo el árbol traqueo-bronquial, inclusive cuando no existe limitación del flujo aéreo.

Hay evidencia de que los linfocitos T y los macrófagos, son las células que predominantemente se infiltran en la pared de las vías aéreas centrales de fumadores, mientras que los neutrófilos son escasos en la pared pero se acumulan en la luz (Finkelstein et al., 1995; Baraldo et al., 2007). Los linfocitos predominantes son CD8⁺, pero también hay acumulación de células T CD4⁺ (Majo et al., 2001). Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos se infiltran en las vías aéreas centrales y periféricas, el parénquima pulmonar y la capa adventicia de las arterias pulmonares, indicando un papel importante en la progresión de la enfermedad. Posiblemente el papel de las células T CD8⁺ en la EPOC es ejercer una función protectora, que mantiene la integridad epitelial ante agentes nocivos (humo tabaco o agentes irritantes). Si el estímulo se transforma en crónico, la acumulación de las células persiste, y por tanto su acción sobre la acumulación y activación de macrófagos se amplifica, generando un círculo vicioso en la patología pulmonar (Borchers et al., 2007).

Se ha descrito un aumento en el número de neutrófilos activados en el esputo y en el lavado bronquioalveolar (BAL) de pacientes EPOC, y se considera que su acumulación se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Lacoste et al., 1993; Noguera et al., 2001, Bizeto et al., 2008) Los neutrófilos contribuyen a la destrucción alveolar y son potentes estimulantes de la secreción mucosa (Ilumets et al., 2007). La acumulación de neutrófilos en las vías aéreas y el parénquima pulmonar está precedida por su adhesión a las células endoteliales. Se ha demostrado que la expresión de E-selectina está aumentada en las células endoteliales de pacientes EPOC, y que los neutrófilos adheridos migran hacia el tracto respiratorio siguiendo los factores quimiotácticos como la IL-8 y el LTB₄ (Tanino et al., 2002). La presencia de neutrófilos y linfocitos T CD8⁺ en la musculatura lisa bronquial de pacientes EPOC, refuerza el papel de éstas

células en la patogénesis de la limitación del flujo aéreo pulmonar (Baraldo et al., 2004).

Además de las células descritas, también se ha reportado un aumento marcado (5-10 veces) de macrófagos en las vías aéreas, parénquima, BAL y esputo de pacientes EPOC, y se ha establecido una correlación entre su acumulación y la severidad de la EPOC. La figura 8 muestra que los macrófagos son activados por el extracto de humo de cigarro y liberan mediadores inflamatorios, estableciendo así la relación entre cigarrillo e inflamación. El incremento de macrófagos en los fumadores y pacientes EPOC, es producto de la acumulación de monocitos circulantes inducido por quimiocinas selectivas para monocitos y linfocitos T (Ilumets et al., 2007; Russel et al., 2002a; Russel et al., 2002b; Di Stefano et al., 2002).

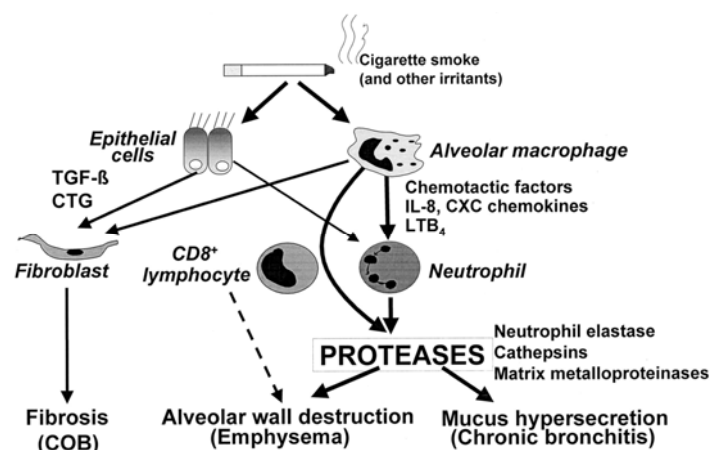


Figura 8. El humo del cigarro (y otros agentes irritantes) activan los macrófagos del tracto respiratorio, que liberaran factores quimiotácticos para los neutrófilos (IL-8 y LTB₄). Estas células liberan proteasas que desintegran el tejido conectivo del parénquima pulmonar causando enfisema y estimulando la hipersecreción de moco. Las células T citotóxicas también son reclutadas y participan en la destrucción de la pared alveolar. Los fibroblastos son activados por factores de crecimiento procedentes de macrófagos y células epiteliales produciendo fibrosis (Barnes et al., 2004).

1.5.3. Estrés oxidativo en la EPOC

La activación endotelial comprende una serie de complejos cambios en el fenotipo de las células que conducen a un aumento en las

interacciones leucocito-endotelio, entre otros efectos. Estos cambios de fenotipo ocurren en respuesta a múltiples estímulos como citocinas inflamatorias, la activación del SRA y estímulos mecánicos como la fuerza de roce, isquemia reperfusion, etc. Numerosos datos bibliográficos implican a las ERO en la génesis de la activación endotelial. El principal mecanismo que conduce a la disfunción endotelial es la generación de anión superóxido que inactiva los efectos vasodilatadores de NO, la reacción también genera peroxinitritos. Además de su efecto sobre el NO, las ERO (principalmente H_2O_2) tiene efectos importantes en la modulación de varias vías de señalización sensibles a ERO, presentes en las células endoteliales y que tienen efecto sobre la expresión de genes y proteínas indispensables para diversas funciones celulares. Como consecuencia se puede aumentar el crecimiento celular, la proliferación, la migración leucocitaria, la subsistencia o la reorganización del citoesqueleto. También pueden afectar a la forma celular, promover la expresión de MAC, la secreción de citocinas inflamatorias, etc. (Dworakowski et al., 2008).

Hay varias fuentes potenciales de anión superóxido en las células, como las mitocondrias, el citocromo P450, el desacoplamiento de la eNOS, la xantina oxidasa y las NADPH oxidasas. De todas ellas, las NADPH oxidasas son las únicas cuya función principal es la producción de ERO y cumplen una función especial en la señalización redox (Dworakowski et al., 2008; Cave et al., 2006; Lambeth et al., 2004). Además las NADPH oxidasas son activadas por la mayoría de los estímulos que causan disfunción y activación endotelial.

NADPH estructura.

Los primeros estudios de la NADPH oxidasa fueron realizados en neutrófilos donde desempeña funciones de defensa contra microorganismos, por sus acciones fagocíticas. Su mecanismo de acción es

generar grandes cantidades de superóxido y protones, razón por la cual se le denominó oxidasa fagocítica (Babior et al., 1973; Babior et al., 2002; Lambeth et al., 2004). Esta constituida por dos subunidades asociadas a membrana, p22phox y gp91phox (Nox2 en la nueva nomenclatura), que son proteínas transmembrana que transportan los electrones a través de las membranas biológicas para reducir el oxígeno a superóxido. El proceso de transferencia electrónica desde el NADPH al oxígeno molecular, y que culmina en la formación de superóxido está catalizada por la oxidasa, que debe ser activada por varias subunidades reguladoras que son trasladadas del citosol a la membrana (p47phox, p67phox, p40phox, Rac-1 y Rac-2). Las diferencia entre en la actividad bioquímica de las oxidasas fagocíticas y no fagocíticas, permitió la identificación de toda una familia de NADPH oxidasas que actualmente reciben las denominaciones de Nox1 a Nox5 (de las iniciales NADPH oxidasa) (Nunoi et al., 1988; Abo et al., 1991; Dworakowski et al., 2008).

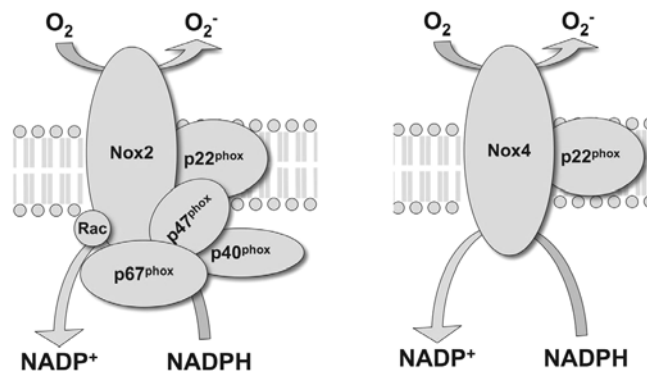


Figura 9. La Nox2 y Nox4 son las isoformas que se expresan en las células endoteliales. La Nox4 no requiere de las subunidades citosólicas para su activación

La expresión de las diferentes isoformas de Nox varía en los diferentes tejidos y células. Nox2 y Nox4 se coexpresan en las células endoteliales, aunque también se pueden expresar Nox1 y Nox5. A diferencia de la Nox2, la activación de Nox4 no requiere de las subunidades citosólicas, todo esto sugiere que están reguladas por

diferentes estímulos y ejercen funciones diferentes (Ago et al., 2004; BelAiba et al., 2007; Griendling et al., 2000, Li et al., 2002).

Como se mencionó la Nox4 es la isoforma más abundante en células endoteliales, aunque Nox1, 2 y 5 también están presentes. Las células musculares lisas expresan Nox1 (en grandes vasos) y Nox2 (vasos de resistencia), y los fibroblastos presentes en la adventicia expresan tanto la isoforma Nox2 como la Nox4.

La Nox4 parece estar activa de forma constitutiva, y no requiere de la participación de las subunidades reguladoras. Se desconoce el estímulo que activa Nox4, pero se produce por acción de los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (Park et al., 2006) o insulina (Mahadev et al., 2004) y su actividad aumenta por estimulación transcripcional del ARNm. La Ang-II aumenta la expresión de Nox1 en músculo liso vascular (Lassegue et al., 2001)

ERO y EPOC

El estrés oxidativo es un factor importante en la fisiopatología de la EPOC. Se produce cuando las ERO, se generan de forma excesiva sobrepasando a los mecanismos antioxidantes de defensa. En la figura 10 se resumen sus efectos en la función pulmonar.

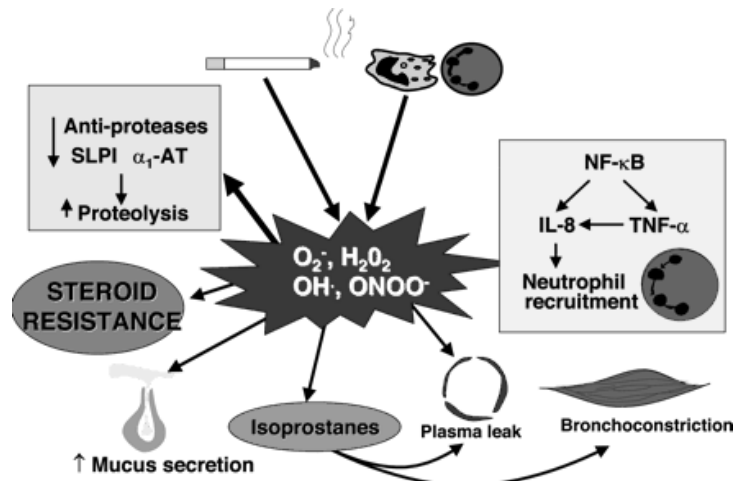


Figura 10. El estrés oxidativo tiene un papel importante en la fisiopatología de la EPOC y amplifica el proceso inflamatorio y destructivo. Las ERO del humo del cigarrillo proceden de células inflamatorias (macrófagos y neutrófilos) activadas, disminuyen las antiproteasas de defensa, activan el NF κ B, estimulando la secreción de citocinas IL-8 y TNF α y aumentan la producción de isoprostanos que afectan la función pulmonar (De Boer et al., 2007)

Las células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos) y estructurales (células epiteliales) producen ERO. El anión superóxido (O_2^-) generado por la NADPH oxidasa, es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la superóxido dismutasa. El H_2O_2 por la acción de la catalasa genera O_2 y agua. O_2^- y H_2O_2 pueden interactuar en presencia de hierro para generar radical hidroxilo ($\cdot OH$), una molécula altamente reactiva. El O_2^- también se puede combinar con NO para formar peroxinitritos, que también producen $\cdot OH$. El estrés oxidativo conduce a la oxidación de ácido araquidónico y a la formación de nuevos mediadores prostanoideos, denominados isoprostanos, que ejercen efectos funcionales importantes como broncoconstricción y extravasación plasmática (figura 10). El humo del cigarrillo es por sí mismo una potente fuente de oxidantes, se estima que la fase gaseosa contiene más de 10^{15} radicales libres (Barnes et al., 2004).

1.5.4. Inflamación sistémica en EPOC

A nivel sistémico se puede detectar la misma reacción inflamatoria anómala al humo del cigarro que se observa en el pulmón. Desde el punto de vista clínico la malnutrición, la pérdida de peso y la disfunción de la musculatura esquelética, son las manifestaciones sistémicas más frecuentes de los pacientes EPOC, con una importante repercusión sobre la calidad de vida y pronóstico de los enfermos.

Durante la pasada década, las investigaciones en las manifestaciones sistémicas de la EPOC, han demostrado un aumento en los niveles de mediadores inflamatorios circulantes, como moléculas de fase aguda (proteína C reactiva, fibrinógeno) y citocinas (IL-6, IL-4 y TNF α) (Augusti et al., 2007; Sin et al., 2007; Barreiro et al., 2008; Foschino Barbaro et al., 2007), los cuales no pueden ser amortiguados mediante aumento de la secreción de mediadores anti-inflamatorios como la IL-10.

- Las células proinflamatorias en los efectos sistémicos. La probabilidad de que los monocitos circulantes liberen moléculas proinflamatorias, y contribuyan en la respuesta inflamatoria sistémica ha sido evaluada en pacientes EPOC estables. Los monocitos aislados de pacientes EPOC liberan significativamente más MMP-9, IL-6 y MCP-1. Además, existe activación de NF κ B, lo que sugiere que este factor de transcripción puede estar involucrado en la activación de monocitos circulantes de pacientes con EPOC (Aldonyte et al., 2003). La activación de neutrófilos, conduce a la potenciación de la respuesta citotóxica y migratoria. Comparados con los controles, en los neutrófilos circulantes de pacientes EPOC, se observa un aumento en la expresión de CD11b/CD18, y son capaces de producir mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno tanto en condiciones basales, como después de la estimulación in vitro (Noguera et al., 2001).

La explicación más obvia de la inflamación sistémica, es que la patología se origine en el pulmón y de allí se extienda a otros órganos y sistemas. Sin embargo, no parece que los efectos extrapulmonares tengan su origen en la inflamación pulmonar, ya que los marcadores inflamatorios en el esputo y en el plasma no muestran una correlación directa (Vernooy et al., 2002; Hurst et al., 2006). En consecuencia, es poco probable que un exceso de mediadores inflamatorios desborde el compartimiento pulmonar, sino más bien, que el proceso inflamatorio se regule de diferente forma en los compartimientos pulmonar y sistémico (Michel et al., 2001). A pesar de los numerosos estudios realizados con muestras pulmonares, en las que se detectó una disminución en el ratio de linfocitos T $CD4^+/CD8^+$ en pacientes EPOC, no hay suficientes estudios que revelen lo mismo en la circulación sistémica. Se ha descrito que el humo del cigarro por sí sólo puede desplazar el número de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$, y que este efecto es reversible cuando se deja de fumar. Sin embargo, el hecho de que personas que han dejado el hábito de fumar presentan signos de inflamación sistémica, refuta la posibilidad de que los componentes del cigarrillo por sí mismos, constituyan el único factor responsable de la inflamación en los pacientes EPOC (Vernooy et al., 2002). Varias vías independientes parecen estar involucradas en el proceso, como la hipoxia que es un problema recurrente en la EPOC. Ya que el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno es vital para la supervivencia, los sistemas fisiológicos deben asegurar una óptima oxigenación de las células. El factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) juega un papel central para señalar la existencia de hipoxia a la maquinaria transcripcional del núcleo de todas las células. HIF-1 activa genes diana cuyos productos participan en la angiogénesis, el metabolismo energético, la eritropoyesis, la inflamación, la proliferación celular, el remodelado vascular y las respuestas vasomotoras (Perez-Amodio et al., 2011; Calzada & Del Peso, 2007).

1.6. FISIOPATOLOGÍA DEL HUMO DEL CIGARRO

Los estudios epidemiológicos demuestran que el hábito de fumar aumenta la incidencia de patología cardiovascular, incluso los fumadores pasivos también muestran mayor riesgo cardiovascular en comparación con los no fumadores (Bolinder et al., 1994). Sin embargo, no se ha esclarecido cuales son los componentes de cigarro y los mecanismos responsables de esta asociación (Ambrose et al., 2004).

1.6.1. Propiedades bioquímicas y físicas del humo de cigarro.

Convencionalmente los componentes del humo del cigarro se han separado en dos fases: la fase particulada y la fase gaseosa. La primera, se define como el material que es retenido cuando el humo del cigarro se hace pasar a través de un filtro de fibra de vidrio, que retiene aproximadamente el 99.9% del material particulado de tamaño $>0.1 \mu\text{m}$. La fase gaseosa, es el material que pasa a través del filtro.

La fase particulada contiene alrededor de 10^{17} radicales libre/g, y la fase gaseosa contiene $>10^{15}$ radicales libres/inhalación. Los radicales de la fase particulada tienen una larga vida media (horas a meses), mientras que los de la fase gaseosa tienen una vida media muy corta (segundos).

También el humo que es inhalado por los fumadores se divide en dos tipos: humo primario: que entra en la boca del fumador por la combustión directa del tabaco, y el humo alterno o secundario: que se emite por la combustión del extremo de cigarro. El humo primario contiene 8% de material particulado y 92% del componente gaseoso (Pryor et al., 1993). El humo del cigarro que está en el ambiente es una combinación del humo secundario (85%) y humo primario (15%). El humo secundario contiene relativamente mayor concentración de los componentes tóxicos gaseosos

que el humo primario. De todos los constituyentes, la nicotina, presente en la fase particulada, es la sustancia adictiva.

1.6.2. Humo de cigarro , disfunción endotelial y aterosclerosis

El humo de cigarro predispone a diferentes patologías asociadas a la aterosclerosis, entre las cuales se puede mencionar, angina estable, patología coronaria aguda, muerte súbita, y accidentes cerebrovasculares (Stolle et al., 2010). El humo del cigarro altera la expresión y actividad de la enzima NO sintasa, comprometiendo la reactividad vascular (Ferrer et al., 2009). También el NO participa en la regulación de la adhesión leucocitaria, la activación plaquetaria, y la trombosis (Gkaliagkousi & Ferro, 2011).

Inflamación: la respuesta inflamatoria es un componente esencial para el inicio y evolución de la aterosclerosis. Se ha descrito que el humo de tabaco aumenta entre un 20 y un 25% el número de leucocitos en sangre periférica (Smith and Fischer, 2001), los niveles de marcadores inflamatorios (Tracy et al., 1997) y de citocinas proinflamatorias (Kalra et al., 1994; Shen et al., 1996). Los monocitos aislados de personas fumadoras muestran mayor expresión de la integrina CD11b/CD18, que aumenta la adhesión de monocitos.

Modificación del perfil lipídico: uno de los efectos del humo del cigarro es promover la aterosclerosis por el cambio del perfil lipídico del fumador, ya que éstos muestran niveles más elevados de LDL, colesterol y triglicéridos y disminución de HDL en comparación con los no fumadores (Craig et al., 1989). El humo del cigarro también promueve la peroxidación lipídica y además las LDL oxidadas (LDLox), activan el endotelio para expresar MAC.

El humo de cigarro tiene más de 4000 componentes conocidos, de los cuales sólo se han aislado unos pocos. El monóxido de carbono (CO),

es uno de ellos, pero su efecto en la enfermedad atero-trombótica no ha sido bien evaluado. En un principio se le consideró el causante de las alteraciones cardiovasculares, pero existen datos que sugieren que el CO no participa en la aterosclerosis o la formación de trombos (Astrup et al., 1979). Se sabe que los hidrocarburos aromáticos policíclicos que se encuentran en la fracción particulada del humo de tabaco aceleran el proceso aterosclerótico. (Penn et al., 1988)

La nicotina es el componente más estudiado, aunque es el que juega un papel importante en el incremento del gasto cardíaco, frecuencia cardíaca y presión arterial, su participación en los procesos atero-trombóticos genera controversia (Clouse et al., 2000; Pellegrini et al., 2001). En varios modelos, grandes dosis de nicotina favorecen la aparición de aterosclerosis. La mayoría de las evidencias sugieren que la nicotina, a concentraciones similares a las encontradas en los niveles sanguíneos de fumadores, tiene un efecto menor en el inicio y progresión de la aterosclerosis (Smith & Fischer, 2001; Sun et al., 2001). De forma similar, el efecto de la nicotina en los factores de riesgo hemostáticos como plaquetas, fibrinógeno, t-PA, PAI-1, tiene un papel insignificante (Benowitz et al., 1997, Pellegrini et al., 2001). Ya se mencionó que la nicotina es la sustancia adictiva del humo de cigarro, lo cual conduce a que el fumador mantenga el hábito y se exponga a los componentes dañinos.

Actualmente, el estrés oxidativo emerge con un papel relevante en la aterosclerosis. (Kojda et al., 1999; Nedeljkovic et al., 2003). En el humo de tabaco, los radicales libres provienen de: 1) de las fases particulada y gaseosa del humo del cigarro. 2) macrófagos circulantes y tisulares activados, 3) fuentes endógenas de ERO, como eNOS desacopladas, xantina oxidasas (XO), NADPH ox y la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La reacción entre radicales libre y NO, no sólo disminuye el NO disponible, sino que genera peroxinitritos, que aumentan el estrés

oxidativo celular (Kojda et al., 1999). Al aumentar el estrés oxidativo conjuntamente con la pérdida de efecto del NO el balance celular se desplaza hacia un ambiente proaterogénico y protrombótico (Nedeljkovic et al., 2003, Ruberg et al., 2002). Muchas de las alteraciones asociadas al humo de tabaco como la disfunción endotelial, efectos proinflamatorios en la pared arterial, efectos protrombóticos, aumento de la reactividad plaquetaria, disminución de la fibrinólisis y la peroxidación de lípidos se explican por el incremento del estrés oxidativo (Heitzer et al., 2000; Kayyali et al., 2003; Guthikonda et al., 2003). Los agentes antioxidantes o aquellos que aumentan los niveles de NO mejoran o revierten los procesos proaterogénicos, proinflamatorios, y protrombóticos. Aunque el mecanismo responsable de las alteraciones cardiovasculares asociadas al humo de tabaco no se ha determinado, el estrés oxidativo parece que juega un papel crucial.

1.7. FRACTALQUINA (FRK)

1.7.1. Estructura y función

La FRK (FRK) conjuntamente con la CXCL16, son las únicas quimiocinas transmembrana. El gen que codifica la FRK se encuentra en el cromosoma 16q13, con genes de quimiocinas que pertenecen a la familia CC (Nomiya et al., 1998). Estructuralmente la FRK contiene múltiples dominios que la hacen diferente a otras quimiocinas. Los primeros 76 aminoácidos del segmento extracelular corresponden al dominio quimiocina, el cuál tiene tres aminoácidos entre los dos residuos de cisteína (CXXXC). El dominio extracelular se conecta con un brazo tipo mucina al dominio transmembrana, seguido por el dominio intracelular de 37 aminoácidos (Bazan et al., 1997) (figura 11).

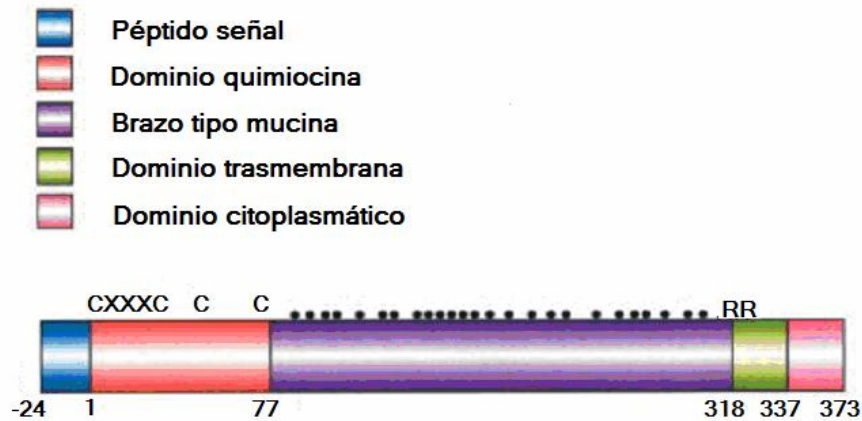


Figura 11. La FRK, una quimiocina CX₃C, es una proteína con 373 aminoácidos, distribuidos en múltiples dominios. Comenzando en el péptido señal que contiene el extremo N-terminal de la quimiocina (residuos 1 a 76), el cual cuenta con tres aminoácidos entre los residuos de cisteína (CX₃C), el brazo tipo mucina (residuos 77 a 317) que contiene el residuos de serina O-glicosilado y treonina, el dominio transmembrana abarca del residuo 318 al 336, y el dominio intracelular de los residuos 337 al 373 (Umehara et al., 2004).

La expresión de FRK aumenta en las células endoteliales por la acción de citocinas inflamatorias, como TNF α , IL-1 e INF γ . La conversión de proteína transmembrana a fracción soluble de la FRK (sFRK), resulta de la acción enzimática ejercida por la enzima convertidora de TNF α (TACE ó [ADAM17]) y ADAM10 (Garton et al., 2001; Tsou et al., 2001; Ludwig et al., 2007) (figura 12).

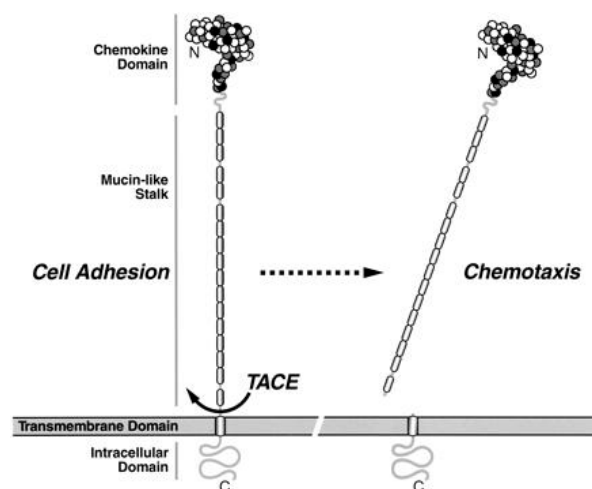


Figura 12. La formación de la fracción soluble de la FRK resulta de la acción enzimática ejercida por la enzima convertidora de TNF α (Charo & Taubman, 2004).

Se desconoce como el dominio quimiocina es reconocido por las metaloproteinasas, pero la generación de dos fragmentos sugiere la existencia de dos sitios de clivaje enzimático. En las células vasculares, los mediadores proinflamatorios estimulan la expresión de CX₃CL1, mientras que las ADAM10 y ADAM17, participan en el reciclaje de la FRK en la superficie celular. Es posible que en procesos inflamatorios severos, la expresión de las quimiocinas exceda a la producida en condiciones fisiológicas (constitutiva), aumentando la presentación de ligandos de quimiocinas en la pared vascular. En el primer paso de la acumulación leucocitaria, la acción de las MMP incrementa la adhesión de leucocitos. Posteriormente, el corte proteolítico de la FRK mediado por las ADAM, termina con la unión celular. Es necesaria la separación CX₃CL1-CX₃CR1 para que los leucocitos acumulados puedan iniciar el proceso de diapédesis y su posterior migración a través del endotelio (Ludwig & Weber, 2007).

También el corte ejercido por ADAM10 y ADAM17, permite generar cantidades crecientes de quimiocinas, que crean el gradiente de concentración necesario para la migración leucocitaria hacia el sitio de inflamación. Una vez que se libera la fracción soluble, el segmento transmembrana sufre un proceso de proteólisis por la acción de γ -secretasas, dando origen a fragmentos implicados en la señalización intracelular (Reiss et al., 2006). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de formación sFRK en el compartimiento intracelular.

1.7.2. FRK como agente quimiotáctico.

La sFRK es un agente quimiotáctico muy eficiente para monocitos, células NK y células T (Bazan et al., 1997). Como el endotelio constituye la primera barrera para la migración leucocitaria, las propiedades de la FRK en las células endoteliales hacen pensar que puede ser una importante vía de control para la extravasación leucocitaria en los lugares con inflamación (figura 13a).

Antes de la identificación de la FRK, se asumía que todas las quimiocinas eran secretadas como moléculas solubles capaces de interactuar con proteoglicanos y glicosaminoglicanos de la matriz y superficie celular, y que eran las responsables de mantener el gradiente quimiotáctico. En el caso de la FRK, el dominio tipo quimiocina presente en el extremo del brazo extracelular, le permite actuar como molécula de adhesión sin la necesidad de asociación con los proteoglicanos o con las moléculas de adhesión. Las células que expresan el receptor CX₃CR1, se unen rápidamente y con gran afinidad a la FRK inmovilizada, o a las células que expresan FRK, tanto en condiciones estáticas como en condiciones fisiológicas de flujo (figura 13b).

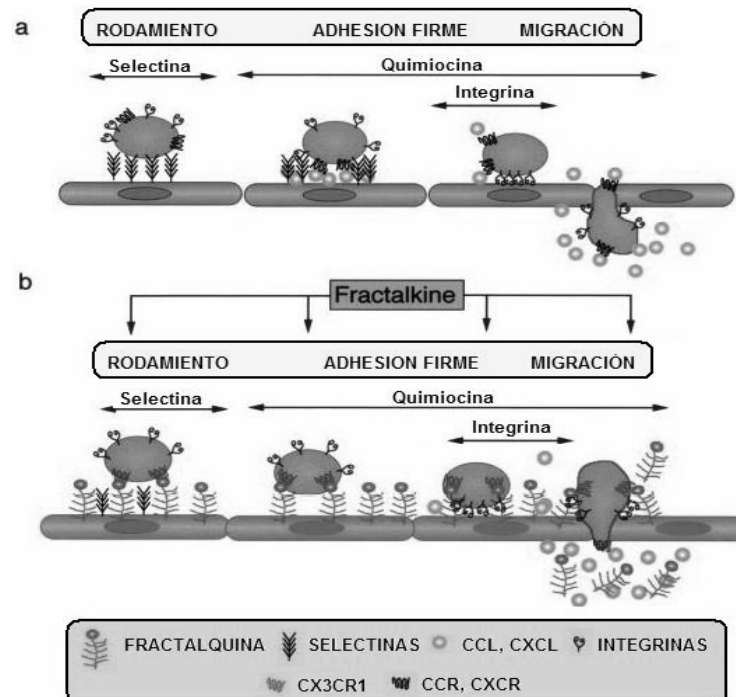


Figura 13: Modelo clásico y vías de la FRK en la cascada de adhesión. La migración leucocitaria desde la circulación hacia los tejidos sigue una serie de pasos: a) La vía clásica se inicia con la adhesión débil y el rodamiento mediado por selectinas. Los leucocitos activados por quimiocinas expresan integrinas que conducen a la adhesión firme, por último los leucocitos migran siguiendo el gradiente quimiotáctico. En la vía alternativa (b), la FRK unida a la membrana de las células endoteliales captura leucocitos, sin la participación de selectinas o integrinas. La interacción de la FRK con su receptor CX₃CR1 incrementa la expresión de integrinas, y por tanto la adhesión firme. Los leucocitos migran siguiendo el gradiente quimiotáctico (Umehara et al., 2004).

Se ha demostrado que las células que expresan CX₃CR1, se adhieren más rápidamente a la FRK inmovilizada que a VCAM-1. De esta forma la FRK facilita la migración leucocitaria, porque no requiere de los dos primeros pasos de la interacción leucocito-endotelio (Umehara et al., 2004).

Muchas células expresan FRK en sistema vascular, la CX₃CL1 se localiza en las células endoteliales y en las células musculares lisas *in situ*. Su expresión aumenta *in vitro*, por la activación de mediadores proinflamatorios, en este sentido, el factor de transcripción NFκB es un regulador importante de la expresión de FRK, que puede ser estimulado por TNFα, IL-1, y LPS (García et al., 2000). Adicionalmente a su efecto en

la adhesión, la FRK al interactuar con su receptor activa señales de transducción dependientes de proteína G, que aumentan la avidéz de las integrinas por sus ligandos.

1.7.3. FRK y leucocitos

El receptor CX₃CR1 se expresa en células neuronales, microglía, monocitos, células T, NK, CD16⁺, células musculares lisas, células endoteliales y plaquetas.

Los linfocitos T colaboradores CD4⁺ (Th), y las células T citotóxicas CD8⁺ (Tc), se dividen en dos poblaciones según su perfil de producción de citocinas. Las células Th1 secretan INF γ , TNF α e IL-2, que median respuestas inmunes contra patógenos intracelulares, y participan en el inicio y desarrollo de la respuesta inmune. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, participan en respuestas inmunes contra patógenos extracelulares, y están asociadas con respuestas inmunes alérgicas (Kourilsky & Truffa-Bachi, 2001).

Las células T citotóxicas CD8⁺, después de la estimulación antigénica empiezan a expresar mediadores de lisis, perforinas y granzimas, y se diferencian en células efectoras T CD8⁺ que poseen una elevada actividad citolítica mediada por INF γ y TNF α . El receptor CX₃CR1 se expresa en la mayoría de las células NK CD16⁺, en la mayoría de los monocitos CD14⁺, y en una fracción sustancial de células T CD3⁺. Además CX₃CR1 se expresa en células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T $\gamma\delta$ y células NK. La mayoría de las células que expresan CX₃CR1 poseen gránulos citoplasmáticos que contienen perforina y granzima B. Colectivamente, estos datos sugieren que CX₃CR1 es un receptor de quimiocinas altamente selectivo y un marcador de superficie para células NK, linfocitos T citotóxicos, y células T $\gamma\delta$.

Es bien sabido que FRK ejerce sus efectos sobre monocitos. Así, existen estudios que indican que FRK induce la migración de monocitos ya que expresan el receptor CX₃CR1 (Bazan et al., 1997; Imai et al., 1997). Además, la FRK induce la migración leucocitaria y estimula la adhesión dependiente de integrinas tanto en la línea celular de monocitos THP-1, como en monocitos aislados. Recientemente, también se ha descrito la expresión del receptor CX₃CR1 en monocitos CD14^{low}CD16⁺, los cuales se unen eficientemente a las células que expresan FRK, facilitando su migración. Por tanto, el sistema CX₃CR1/FRK puede contribuir a la patogénesis vascular y daño tisular por estimular la adhesión celular y facilitar la migración de linfocitos y monocitos que expresan el receptor CX₃CR1 (Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003).

1.7.4. FRK y citotoxicidad

La mayoría de las células NK CD16⁺ expresan CX₃CR1, sugiriendo que son blancos importantes de los efectos biológicos de la FRK (quimiotaxis, adhesión, y activación). Adicionalmente, la sFRK puede inducir la migración de células NK y la exocitosis de sus gránulos. De forma similar a las células NK, las células T son CD8⁺, CD4⁺, y expresan el receptor CX₃CR1, muestran una diferenciación terminal a fenotipos efectores que contienen gránulos citotóxicos. Como la activación excesiva de linfocitos citotóxicos puede producir daño vascular o tisular, es posible que la FRK expresada en las células endoteliales participe en el proceso. Experimentos en HUVEC transfectadas con cDNA para FRK (sin cambios en ICAM-1 o VCAM-1), muestran un aumento en la interacción con células NK, y en la citólisis causada por estas células. Esto sugiere que la expresión de FRK en el sitio de inflamación puede atraer y activar células NK a través de CX₃CR1, y que las células NK activadas pueden lisar

células endoteliales vecinas independientemente de la expresión de MHC clase I (Yoneda et al., 2000).

1.7.5. FRK e inflamación

Nishimura y col. (2002), observaron que además de la función quimiotáctica de la sFRK, la fracción unida a la membrana incrementa la acción de otras quimiocinas estimulando la migración de leucocitos que expresan CX₃CR1. La migración de células NK (CX₃CR1⁺/CXCR1⁺) y células T CD8⁺ (CX₃CR1⁺/CCR5⁺) inducida por las quimiocinas IL-8, (ligando para CXCR1) y MIP-1β, (ligando para CCR5) aumenta significativamente en presencia de FRK. En consecuencia, la FRK expresada en el endotelio inflamado puede conducir a la rápida captura de células efectoras citotóxicas (que expresan CX₃CR1) de la sangre y promover su migración hacia el tejido.

Las células NK son importantes en la inmunidad innata a través de la producción de citocinas como INFγ, TNFα, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-10 e IL-15. Yoneda y col. (2000), demostraron un aumento marcado de INFγ, cuando se estimulan de células NK con FRK inmovilizada, o con cocultivos de células NK y células que expresan FRK, sugiriendo que la FRK expresada en las células endoteliales participa en el desarrollo de respuestas Th1. El INFγ también estimula la expresión de FRK en las células endoteliales, indicando la existencia de un sistema paracrino de retroalimentación, en el cual las células endoteliales pueden ser activadas para producir más FRK.

1.7.6. FRK y aterosclerosis

La lesión aterosclerótica se caracteriza por la infiltración de diversos tipos celulares, principalmente macrófagos y células T, los cuales participan en una secuencia de respuestas inflamatorias. Diversos estudios

sugieren que la FRK puede estar involucrada en la fisiopatología de la aterosclerosis. De igual forma, también se ha detectado la expresión de FRK en macrófagos presentes en la lesión aterosclerótica (Lucas et al., 2003, Wong et al., 2002), en las células musculares lisas de la capa muscular media de arterias coronarias con enfermedad aterosclerótica, y en la capa íntima de vasos de pacientes diabéticos.

Los monocitos circulantes son los precursores de las células espumosas presentes en la lesión aterosclerótica, y la FRK tienen un papel importante en la migración de monocitos de la sangre al espacio subendotelial de la pared vascular. Estudios llevados a cabo por diferentes grupos (Lesnik et al., 2003; Combadiere et al., 2003) indican que la expresión de FRK aumenta en las lesiones ateroscleróticas de ratones deficientes de apolipoproteína E (apoE^{-/-}), y que ratones doble KO (CX₃CR1^{-/-} y apoE^{-/-}) muestran una disminución de lesiones ateroscleróticas y una menor acumulación de macrófagos. En animales deficientes en CX₃CR1, las lesiones ateroscleróticas muestran menos monocitos que los controles. En resumen, la progresión de la lesión aterosclerótica depende de la acumulación de monocitos y, por tanto, la interacción CX₃CL1-CX₃CR1 podría constituir un paso crítico en el desarrollo de dicho proceso (Ludwig & Weber, 2007).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El sistema renina-angiotensina (SRA), es un sistema hormonal complejo que es crucial para la regulación del balance hidroelectrolítico y de la presión arterial. La ECA se encuentra principalmente en el plasma y en la superficie de las células endoteliales, y predomina en el espacio intravascular. Es la vía predominante en la formación de Ang-II, que además de sus funciones fisiológicas, se ha demostrado que posee acciones proinflamatorias (Alvarez et al., 2004; Kramkowski et al., 2006; Piqueras et al., 2000).

La administración de IECAs ayudó a descubrir la existencia de las vías ECA-independientes. La quimasa mastocitaria se ha descrito como la principal enzima formadora de Ang-II independiente de la ECA. Se encuentra en los gránulos secretores de los mastocitos (Doggrell and Wanstall, 2004) y se localiza en el corazón y en la adventicia de los vasos sanguíneos, pero no en plasma, siendo predominantemente extravascular (Borland et al., 2005; Doggrell and Wanstall, 2004). La quimasa se encuentra inactiva dentro de los gránulos secretores de los mastocitos y se activa con la desgranulación mastocitaria (Caughey et al., 2000).

El papel de la quimasa en los humanos, se ha deducido principalmente de estudios bioquímicos y funcionales utilizando la quimostatina en tejidos homogenizados y en vasos sanguíneos aislados. Pero las técnicas utilizadas para estos estudios pueden sobreestimar su actividad. Estos hechos sugieren que los estudios in vitro no aportan datos claros sobre la verdadera relevancia de la quimasa en la conversión de Ang-I a Ang-II.

Ya que tanto en el tejido vascular humano como en el de otros animales, están presentes los dos tipos de sistemas generadores de Ang-II, este estudio es de los primeros que se ha planteado caracterizar sistemáticamente la contribución de la ECA frente a la quimasa en la

conversión de Ang-I a Ang-II mediante el empleo de un modelo farmacológico *in vivo*.

Por tanto el primer objetivo que nos hemos planteado es:

1^{er} objetivo:

Caracterizar la contribución de la ECA frente a la quimasa mastocitaria en la acumulación leucocitaria inducida por Ang-I.

Por otro lado, en la infiltración leucocitaria intervienen tanto las MAC como diversos factores quimiotácticos. Las quimiocinas se caracterizan por manifestar actividad quimiotáctica selectiva para distintos subtipos celulares (Bazan et al., 1997). Distintas quimiocinas han sido involucradas en la formación de la lesión aterosclerótica, entre ellas la FRK (FRK) (Bazan et al., 1997; Imai et al., 1997).

La FRK (CX₃CL1), es el único miembro de la subfamilia CX₃C que se expresa de forma soluble o unida a membrana en el endotelio inflamado. La presencia de FRK en la pared vascular y su capacidad de actuar como molécula de adhesión y agente quimiotáctico para monocitos y linfocitos sanguíneos, son cualidades que hacen que sea una molécula atractiva para participar en el proceso de formación de las lesiones ateroscleróticas (Lucas et al., 2003, Wong et al., 2002; Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003).

La EPOC, se caracteriza por una disminución progresiva e irreversible de la función pulmonar producto de una respuesta inflamatoria crónica de los pulmones a partículas y gases nocivos, principalmente del humo de tabaco. Sin embargo, existen claras evidencias de la existencia de efectos sistémicos asociados al consumo de tabaco, entre los que cabe destacar la mayor incidencia de enfermedad coronaria, cáncer en diferentes órganos e infecciones del tracto respiratorio, tanto agudas como crónicas.

Estudios recientes sugieren que los linfocitos T CD8⁺ y los monocitos están implicados en la patogénesis de la EPOC y que se encuentran activados en la sangre periférica de pacientes que sufren esta enfermedad (McComb et al., 2008). Ya que tanto los linfocitos T CD8⁺ como los monocitos expresan receptores funcionales CX₃CR1, cabría esperar que FRK participe en desórdenes cardiovasculares inducidos por el humo de tabaco. Por ello el segundo objetivo que nos hemos planteado es:

2º objetivo:

Estudiar la inflamación vascular inducida por humo de tabaco, especialmente en órganos distantes del pulmón, centrándonos en el posible papel funcional de CX₃CL1 o FRK, ya que ha sido implicada en aterosclerosis y presentan actividad quimiotáctica sobre leucocitos mononucleares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIOS REALIZADOS CON ANIMALES

3.1.1. Estudio de las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I, CMP48/80 y humo de tabaco mediante el empleo de la microscopía intravital en el músculo cremaster de ratón.

3.1.1.1. Animales

Para la realización de estos estudios se emplearon ratones macho adulto C57BL/6 de 8 semanas de edad (Charles River, Barcelona, España), ratones deficientes en mastocitos WBB6F1/J-Kit^w/Kit^{w-v} (Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine, USA) y ratones deficientes en el receptor de FRK (CX₃CR1^{-/-}, BL/6 *background*). Estos ratones fueron donados por el Dr. Andreas Ludwig (Institute of Pharmacology and Toxicology, RWTH Aachen University, Aachen, Alemania).

3.1.1.2. Mantenimiento de los animales

Los animales se mantuvieron con agua y comida (Harlan Ibérica, S.A) bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 1 °C), humedad (40- 45 %) y el adecuado fotoperiodo con luz de 7,30 h a 14,30 h. Todos los protocolos utilizados en el estudio siguieron las recomendaciones del comité de uso y cuidados de animales de la Universidad de Valencia.

3.1.1.3. Preparación de los animales

La preparación del cremáster de ratón se realizó según el método descrito anteriormente (Sanz et al. 2001). En resumen, los ratones con un peso entre 23-30 g fueron anestesiados (i.p.) con una mezcla de hidrocloreuro de ketamina (50 µg/ml) y medetomidina (1 µg/ml). La vena

yugular se canuló con un catéter de polietileno para permitir la administración intravenosa de anestesia adicional. Posteriormente, se fijó el ratón a la plataforma y se realizó una incisión en la base de los testículos para extraer el músculo cremáster, fijándolo a la base de la misma. Se practicó una incisión longitudinal con un electrocauterio y se ataron los extremos con hilos de sutura para extender totalmente la preparación sobre la plataforma. Finalmente se colocó un cubreobjetos sobre la preparación para observar al microscopio. El músculo se perfundió continuamente con tampón salino bicarbonatado a 37°C, pH de 7,4 y a una velocidad de perfusión de 1 ml/min.

La microcirculación del músculo cremáster se observó a través de un microscopio ortostático (Nikon Optiphot-2, SMZ1, Badhoevedorp, Holanda) con un objetivo 50x (Nikon SLDW), y un ocular 10x. Con la ayuda de una cámara de video (Sony SSC-C350P, Colonia, Alemania) montada sobre el microscopio, se proyectaron las imágenes sobre un monitor a color (Sony Trinitron PVM-14N2E), grabándose las mismas en un magnetoscopio (Sony STV-S3000P) que superpone el tiempo y la fecha para su análisis posterior (Fig. 14).



Figura 14: Foto representativa del equipo de microscopía intravital.

Para la realización del estudio se seleccionaron vénulas y arterias de 20-40 μm de diámetro. Para la medida del diámetro vascular se empleó un "video caliper" (Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, College Station, TX, EEUU). La velocidad de los glóbulos rojos (V_{rbc}), en el torrente sanguíneo en estudio, fue también medida en el momento, utilizando un "optical Doppler velocimeter" (Microcirculation Research Institute). La medida del flujo sanguíneo (V_{mean}) se determinó mediante la aplicación de diversos cálculos matemáticos asumiendo una geometría cilíndrica ($V_{\text{mean}} = V_{\text{rbc}}/1,6$). Además, se calculó el "shear rate" o fuerza de cizallamiento de la pared vascular (γ) basándose en la definición newtoniana $\gamma = 8 \times (V_{\text{mean}}/D_v) \text{ s}^{-1}$, en la que D_v es el diámetro vascular (House and Lipowsky, 1987).

3.1.1.4. Determinación de los parámetros leucocitarios.

El número de leucocitos en fase de rodamiento, adheridos, y emigrados fueron determinados posteriormente mediante análisis de las imágenes grabadas en las cintas de video. Se define un leucocito en fase de rodamiento cuando su velocidad es inferior a la de los eritrocitos en el torrente circulatorio. El flujo de leucocitos en fase de rodamiento se calcula determinando el número de leucocitos que cruzan un punto de referencia del vaso durante un minuto. El mismo punto de referencia se debe utilizar a lo largo del experimento ya que los leucocitos pueden rodar en una sola sección del vaso antes de volver al torrente sanguíneo o pasar a convertirse en leucocitos adheridos. La velocidad de rodamiento (V_{wbc}) se determinó calculando el tiempo requerido por un leucocito en fase de rodamiento para recorrer 100 μm de microvaso y es expresada en $\mu\text{m}/\text{s}$. Un leucocito se define como adherido al endotelio vascular si permanece estacionado durante 30 segundos o más. La adhesión leucocitaria se expresa como el número de leucocitos adheridos por 100 μm de vaso. La migración

leucocitaria se expresa como el número de glóbulos blancos emigrados por campo visual rodeando el vaso en estudio. Las respuestas leucocitarias se midieron en 3-5 arteriolas o vénulas diferentes seleccionadas al azar.

3.1.1.5. Estudio de las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I, CMP48/80 y la combinación de ambos estímulos mediante el empleo de la microscopía intravital en el músculo cremáster de ratón.

Protocolos experimentales

En un primer estudio, con el fin de conocer los efectos, establecer la dosis y el tiempo óptimo para evaluar el efecto de Ang-I, se llevaron a cabo una serie de ensayos preliminares determinando las interacciones leucocito-endotelio inducidas por este decapeptido a distintos tiempos y dosis. Igualmente, a otro grupo de animales se administró Ang-II para evaluar su efecto en este protocolo. En un tercer grupo se evaluó las consecuencias de la degranulación mastocitaria mediante administración del compuesto 48/80 (CMP48/80). Tanto la Ang-I, como la Ang-II y el CMP 48/80 se administraron localmente mediante inyección intraescrotal en un volumen de 100 μ l. Las medidas se efectuaron a la hora, a las 4 y a las 24 horas en los siguientes grupos experimentales tras recibir los distintos tratamientos.

- A. Tampón
- B. Ang-II (100 nM).
- C. Ang-I (1 nM).
- D. Ang-I (10 nM).
- E. Ang-I (100 nM).
- F. CMP48/80 (1 μ g/ml).

Transcurrido el tiempo establecido, los animales fueron sometidos a la cirugía correspondiente, el cremáster fue expuesto para su visualización y tras 30 minutos de estabilización se procedió a la medida del flujo de leucocitos en fase de rodamiento, velocidad de rodamiento, número de leucocitos adheridos, número de leucocitos emigrados, Vrbc (velocidad de eritrocitos), diámetro y fuerza de cizallamiento a nivel venular. En las arteriolas se determinó el número de leucocitos adheridos, Vrbc (velocidad de eritrocitos), diámetro vascular y fuerza de cizallamiento. Previamente se demostró que la dosis de CMP48/80 utilizada en nuestros estudios causó interacciones leucocito-endotelio en un modelo similar de microscopía intravital (Gaboury et al., 1995).

Nuestros resultados preliminares demostraron que la exposición a Ang-II, Ang-I o CMP48/80 durante 4 y 24 horas causaban claras interacciones leucocito-endotelio en arteriolas, si bien a la hora se detectaron ya en vénulas post-capilares. Se consideró que la dosis de 100 nM Ang-I mostraba un efecto similar a Ang-II cuando ésta era ensayada a una dosis de 100 nM, igualmente se consideró escoger el tiempo de 4 h para la realización del resto de estudios adicionales.

Basándonos en estos resultados (Ang-I 100 nM, 4 h), se llevó a cabo un segundo estudio en el cuál se intentó establecer el papel de la ECA y la quimasa mastocitaria en las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I. Un primer grupo de animales fue pretratado con un antagonista selectivo del receptor AT₁ de Ang-II, el losartán (10 mg/kg, i.p.). Un segundo grupo fue pretratado con un inhibidor de la ECA, el enalapril (30 mg/kg, p.o.), 1 hora antes de la inyección intraescrotal de Ang-I 100 nM. Finalmente, el tercer grupo de animales fue pretratado con un inhibidor de la quimasa, la quimostatina (10 mg/kg, i.p.). Tanto el losartán como la quimostatina fueron administrados 30 minutos antes de la inyección intraescrotal de Ang-I 100 nM. Las respuestas leucocitarias de cada grupo

se evaluaron 4 horas después de la administración del estímulo. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- A. Tampón.
- B. Ang-I (100 nM).
- C. Ang-I (100 nM) + Losartán (10 mg/kg).
- D. Ang-I (100 nM) + Enalapril (30 mg/kg).
- E. Ang-I (100 nM) + Quimostatina (10 mg/kg).

Estas dosis de losartán, enalapril y quimostatina ya se habían probado anteriormente en estudios in vivo y se había observado que inhibían las respuestas leucocitarias inducidas por Ang-II, y la actividad de la ECA y de la quimasa respectivamente (Álvarez et al., 2004; Goto et al., 2000; Chatterjee et al 2001).

Con el fin de dilucidar el posible papel de la quimasa mastocitaria, en otra serie de experimentos se administró CMP48/80 1 µg/ml. Un grupo de animales fue pretratado con losartán (10 mg/kg, i.p.). Otro grupo de animales fue pretratado con enalapril (30 mg/kg, p.o.), 1 h antes de la administración intraescrotal de CMP48/80 1 µg/ml. Un tercer grupo fue pretratado con quimostatina (10 mg/kg, i.p.) y a un último grupo se le administró mepiramina (3 mg/kg), un antagonista de los receptores H₁ de histamina, 30 minutos antes de la administración intraescrotal del CMP48/80 (1 µg/ml). Al igual que en el protocolo anterior tanto losartán como quimostatina se administraron 30 minutos antes que el CMP48/80 1 µg/ml. En este caso se establecieron los siguientes grupos experimentales:

- A. Tampón
- B. CMP48/80 (1 µg/ml).
- C. CMP48/80 (1 µg/ml) + Losartán (10 mg/kg).
- D. CMP48/80 (1 µg/ml) + Enalapril (30 mg/kg).
- E. CMP48/80 (1 µg/ml) + Quimostatina (10 mg/kg).
- F. CMP48/80 (1 µg/ml) + Mepiramina (3 mg/kg).

Ya que las respuestas leucocitarias inducidas por el CMP48/80 no se vieron completamente afectadas por ningún tratamiento (losartán, enalapril, quimostatina o mepiramina) en la microcirculación del cremáster de ratón, a excepción de la velocidad de rodamiento, a otro grupo de animales se les administró intraescrotalmente la combinación de ambos estímulos, Ang-I (100 nM) y CMP48/80 (1 µg/ml), para observar las respuestas obtenidas y compararlas con aquellas que se producían cuando cada estímulo se administraba por separado. En estos experimentos, los animales fueron pretratados con losartán, enalapril, quimostatina, o con una combinación de ambos inhibidores enzimáticos 30 o 60 minutos antes de la coadministración vía intraescrotal de ambos estímulos. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- A. Tampón.
- B. Ang-I 100 nM
- C. CMP48/80 (1 µg/ml)
- D. Ang-I 100 nM + CMP48/80 (1 µg/ml)

Siguiente protocolo:

- A. Tampón.
- B. Ang-I 100 nM + CMP48/80 (1 µg/ml)
- C. Ang-I 100 nM + CMP48/80 (1 µg/ml) + Losartán (10 mg/kg).
- D. Ang-I 100 nM + CMP48/80 (1 µg/ml) + Enalapril (30 mg/kg).
- E. Ang-I 100 nM + CMP48/80 (1 µg/ml) + Quimostatina (10 mg/kg).
- F. Ang-I 100 nM + CMP48/80 (1 µg/ml) + Enalapril (30 mg/kg) + Quimostatina (10 mg/kg).

En otro grupo de experimentos, los animales se pretrataron con cromolín, un agente estabilizador de mastocitos. Se administró a una dosis de 100 mg/kg, i.p. 30 min antes y 3,5 h después de la administración intraescrotal del estímulo. Además, también se añadió esta sustancia al tampón de perfusión a una concentración de 0,33 mg/ml según se había descrito previamente (Gaborry et al., 1995). Los grupos experimentales fueron:

- A. Tampón.
- B. Ang-I 100 nM +CMP48/80 (1 µg/ml).
- C. Ang-I 100 nM +CMP48/80 (1 µg/ml) + Cromolín (100 mg/kg).

Para confirmar que efectivamente la quimasa mastocitaria estaba generando Ang-II a partir de Ang-I, se administró salino o la combinación de Ang-I + CMP48/80 a ratones deficientes en mastocitos WBB6F1/J-Kit^w/Kit^{w-v} y se evaluaron las respuestas 4 horas después de la

administración del estímulo. Además un grupo de estos ratones KO en mastocitos también fue pretratado con cromolín antes de la administración intraescrotal del estímulo. Los grupos experimentales fueron:

- A. Tampón.
- B. Ang-I 100 nM
- C. CMP48/80 (1 µg/ml).
- D. Ang-I 100 nM +CMP48/80 (1 µg/ml).
- E. Ang-I 100 nM +CMP48/80 (1 µg/ml) + Cromolín (100 mg/kg).

3.1.1.6. Estudio de las interacciones leucocito- endotelio inducidas por humo de tabaco en ratones salvajes (CX₃CR1^{+/+}) y ratones deficientes en el receptor de FRK (CX₃CR1^{-/-}) mediante el empleo de la microscopía intravital en la microcirculación cremastérica del ratón.

Protocolo experimental

El protocolo experimental será semejante al descrito por Doz y col. (2008). Los animales (C57BL/6J o deficientes en el receptor de FRK (CX₃CR1), se colocaron en una cámara de plexiglás de 19 cm³. El humo producido por la combustión del cigarrillo se introducía en la cámara donde estaban los ratones a un flujo de 25 ml/min. Por tanto, los ratones fueron expuestos al aire o al humo de 10 cigarrillos diarios (Cigarrillos normalizados, Universidad de Kentucky con filtro; 3R4F cigarrillos de investigación: 15 mg de alquitrán y 1,16 mg de nicotina) en dos sesiones de 30 minutos separadas por un espacio de 30-60 minutos.

Grupos experimentales

Con el fin de investigar el efecto del humo de tabaco sobre las interacciones leucocito-endotelio en la microcirculación cremastérica de ratones salvajes ($CX_3CR1^{+/+}$) y ratones deficientes en el receptor de FRK ($CX_3CR1^{-/-}$), se estudiaron los siguientes grupos experimentales:

- A. Ratones salvajes ($CX_3CR1^{+/+}$)
- B. Ratones $CX_3CR1^{-/-}$

Ambos grupos experimentales se expusieron bien a aire o a humo de tabaco durante 3 días y las respuestas se evaluaron 16 horas después de la última exposición. Transcurrido el tiempo establecido, los animales fueron sometidos a la cirugía correspondiente, el cremáster fue expuesto para su visualización y tras 30 minutos de estabilización se procedió a la medida del flujo de leucocitos en fase de rodamiento, velocidad de rodamiento, número de leucocitos adheridos, número de leucocitos emigrados, Vrbc (velocidad de eritrocitos), diámetro y fuerza de cizallamiento a nivel venular. En las arteriolas se determinó el número de leucocitos adheridos, Vrbc (velocidad de eritrocitos), diámetro vascular y fuerza de cizallamiento.

Una vez finalizada la microscopía intravital, de algunos ratones se obtuvo el LBA (lavado broncoalveolar) y de otros se guardaron los pulmones en formol para realizar el estudio inmunohistoquímico.

3.1.2. Estudio y cuantificación de la desgranulación mastocitaria in vivo empleando la tinción con azul de toluidina

El grado de activación mastocitaria en la microcirculación cremastérica se determinó utilizando la tinción con azul de toluidina al 1%. Tras la realización de la cirugía la preparación cremastérica se cubrió totalmente con la solución de azul de toluidina y pasados 2 minutos se

realizaron varios lavados con la solución tampón. Se analizaron 5 campos al azar y se contó el número de mastocitos desgranulados perivasculares por 100 μm de vaso.

3.1.3. Medida de la actividad formadora de Ang-II de las vías dependientes e independientes de ECA en el músculo cremaster de ratón.

La actividad formadora de Ang-II se determinó en un homogenado de cremasters siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Li et al., 2004). En resumen, los cremasters se colocaron en un eppendorf que contenía 2 ml del tampón NaH_2PO_4 50 mM, pH 7,4. A continuación se homogenizaron utilizando un homogenizador Polytron a 9000 rpm durante 15 seg a 4°C. Una vez conseguido el homogenado, se centrifugó a 30,000g durante 20 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se guardó el precipitado. Esta centrifugación se repitió 2 veces. El precipitado se resuspendió en 0,5 ml de un tampón NaH_2PO_4 50 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 100 mM y MgCl_2 10 mM. Se prepararon unos eppendorf con 25 μl del tampón de ensayo (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, KCl 0,5 M y Triton X-100 al 0,01%). A cada tubo se le añadieron 10 μl del precipitado de los cremasters. A continuación se realizaron los siguientes tratamientos añadiendo:

- A. 5 μl de tampón de ensayo.
- B. 5 μl de captopril 100 μM .
- C. 5 μl de quimostatina 10 μM .
- D. 2,5 μl de captopril + 2,5 μl de quimostatina.

Pasados los 45 minutos de preincubación a 0°C, se añadieron 10 μl de Ang I 1 mM a los 40 μl totales del extracto cremastérico y se incubaron

durante 100 minutos a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron 300 µl de etanol 96° para detener la reacción. Las proteínas precipitadas se eliminaron mediante centrifugación, y el sobrenadante, que contenía las angiotensinas se desecó eliminando completamente el etanol. Los niveles de Ang-II se determinaron con un kit de ELISA de alta sensibilidad (SPIbio, Montigny, le Bretonneux, Francia).

3.1.4. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

3.1.4.1. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de la ECA en vénulas y arteriolas de la microcirculación del músculo cremaster de ratón.

Preparación de las muestras y protocolo experimental.

En un primer estudio la inmunohistoquímica se realizó para detectar presencia de la ECA, tanto en vénulas como en arteriolas de la microcirculación cremastérica en los ratones salvajes (C57BL/6) y en los ratones deficientes en mastocitos (WBB6F1/J-Kit^w/Kit^{w-v}) tratados con salino, Ang-I, CMP48/80 y Ang-I+CMP48/80. Una vez finalizada la microscopía intravital, se aisló el cremaster y se fijó con una solución extemporánea consistente en metanol (60%), cloroformo (30%) y ácido acético glacial (10%). Se dejó 30 minutos en esta solución y se guardó en nevera con etanol al 80 % hasta su procesamiento. El cremáster se incluyó en parafina y se realizaron cortes de 4 µm. Las muestras fueron desparafinadas en estufa a 56°C durante 15-30 minutos. A continuación se hidrataron pasándolas por xilol y alcoholes decrecientes (100%, 80%, 70%) y se lavaron con PBS. A continuación, se inhibió la peroxidasa endógena con una mezcla de metanol y peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 110 volúmenes) durante 30 minutos, y se realizaron 3 lavados con agua

destilada. Las preparaciones se incubaron con el anticuerpo monoclonal frente a ECA de ratón (dilución 1:100) durante 1 h, posteriormente se lavaron con PBS y se añadió el anticuerpo secundario (según instrucciones del kit Em-Vision). Transcurridos 15 minutos, se revelaron con DAB (diamino bezamida) dilución 1:50, se lavaron con agua destilada y se contrastaron con hematoxilina. Finalmente las preparaciones se deshidrataron utilizando alcoholes crecientes (70%, 80%, 100%) y xiloles y se montaron con un cubre y medio de montaje (Entellán).

La tinción se consideró positiva cuando se observó una coloración marrón alrededor de las vénulas y de las arteriolas.

Con las mismas muestras se llevó a cabo la tinción con azul de toluidina para detectar los mastocitos en las distintas preparaciones. Una vez desparafinadas, las muestras se sumergieron en una solución de azul de toluidina 1% durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada. A continuación se deshidrataron y se montaron con el mismo medio de montaje. Los mastocitos desgranulados adquirieron una coloración azul-violácea, distinguiéndose así de aquellos sin desgranular.

3.1.4.2. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de FRK en vénulas y arteriolas de la microcirculación del músculo cremaster de ratón.

Preparación de las muestras y protocolo experimental.

En un segundo estudio, se evaluó la expresión de FRK en la microcirculación cremastérica tanto en vénulas como en arteriolas de los ratones salvajes (CX₃CR1^{+/+}) expuestos bien a humo de tabaco o a aire siguiendo un protocolo idéntico al explicado en el apartado 3.1.1.6 de este mismo capítulo. En este caso, las preparaciones se incubaron con el anticuerpo frente a FRK de ratón (dilución 1:100) durante 1 h.

Posteriormente se lavaron con PBS y se añadió el anticuerpo secundario (según instrucciones del kit Em-Vision). Transcurridos 15 minutos, se revelaron con DAB (diamino bezamida) dilución 1:50, se lavaron con agua destilada y se contrastaron con hematoxilina. Finalmente las preparaciones se deshidrataron utilizando alcoholes crecientes (70%, 80%, 100%) y xiloles y se montaron con un cubre y medio de montaje (Entellán)

La tinción se consideró positiva cuando se observó una coloración marrón alrededor de las vénulas o arteriolas.

3.1.4.3. Estudio de la expresión de la quimasa mastocitaria en vénulas y arteriolas de la microcirculación del músculo cremaster de ratón mediante inmunofluorescencia.

Preparación de las muestras y protocolo experimental.

En este estudio, la inmunofluorescencia se llevó a cabo para visualizar las áreas donde se localizaba la quimasa mastocitaria, tanto en vénulas como en arteriolas de la microcirculación cremastérica en los ratones salvajes (C57BL/6) y en los ratones deficientes en mastocitos (WBB6F1/J-Kit^w/Kit^{w-v}) tratados con salino, Ang-I, CMP48/80 y Ang-I+CMP48/80. El protocolo que se realizó fue similar al descrito en el apartado 3.1.4.1, con la diferencia de que las preparaciones se incubaron con proteinasa K diluida 1:40 durante 8 minutos para desenmascarar el antígeno y seguidamente se bloquearon con suero de caballo al 5% en PBS para bloquear las respuestas inespecíficas. A continuación se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C y después 1 hora a 37°C. Para detectar la quimasa mastocitaria se utilizó un anticuerpo policlonal anti-mMPC-4 de ratón, generado en conejo (dilución 1:50). A continuación se lavaron con PBS durante 10 min (3 veces) y posteriormente las preparaciones se incubaron con un anticuerpo generado

en cabra frente a conejo marcado con Alexa 635 (dilución 1:500) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, finalmente se montaron con SlowFade Gold antifade reagents. Las imágenes se tomaron en verde mediante microscopia confocal (Leica TCS/SP2, Solms, Germany) a 630x aumentos.

La reacción se consideró positiva cuando se observó fluorescencia verde alrededor de los vasos.

3.1.4.4. Estudio histológico de preparaciones de pulmón de ratón mediante la tinción de hematoxilina-eosina.

Preparación de las muestras y protocolo experimental.

Los pulmones de los ratones salvajes ($CX_3CR1^{+/+}$) y de los ratones deficientes en el receptor de FRK ($CX_3CR1^{-/-}$) expuestos a humo de tabaco o a aire se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4 μm . Las muestras fueron desparafinadas, hidratadas y pretratadas siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.1.4.1. Una vez inhibida la peroxidasa endógena con una mezcla de metanol y peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 110 volúmenes) se llevó a cabo la tinción con hematoxilina-eosina. Después de realizar 3 lavados con agua destilada las preparaciones se deshidrataron y montaron de la misma manera que en el apartado 3.1.4.1.

3.1.4.5. Estudio de los diferentes tipos celulares presentes en el lavado broncoalveolar de ratón mediante recuento celular en cámara de Neubauer y tinción diferencial.

Obtención del lavado broncoalveolar (LBA).

El ratón anestesiado, se fijó a un soporte, se aisló parcialmente la tráquea y se canuló. Con la cánula inmovilizada se introdujeron 600 μ l de salino en los pulmones del ratón y se extrajo el mismo volumen con ayuda de una jeringa. Este lavado se repitió un total de 5 veces. Tras la obtención de aproximadamente 3 ml de LBA, los tubos se centrifugaron 10 min a 1200 rpm y el sobrenadante se guardó a -80°C . Las células se resuspendieron en 500 μ l de salino. El LBA se obtuvo tanto de los ratones salvajes ($\text{CX}_3\text{CR1}^{+/+}$) como de los ratones deficientes en el receptor de FRK ($\text{CX}_3\text{CR1}^{-/-}$) expuestos bien a aire o a humo de tabaco.

Recuento con cámara de Neubauer y tinción diferencial.

El recuento de las células totales se hizo con la cámara de Neubauer. Se realizó una dilución 1/2 de la suspensión de células con azul de tripán al 0,4 %. Además se hizo una extensión celular por citospin para realizar una tinción diferencial que nos permitió determinar el porcentaje de cada tipo celular presente en las muestras. Para ello se utilizó la tinción rápida para hematología que consta de tres soluciones distintas:

- 0,0002 % de cristal violeta en metanol (20 seg).
- 0,08 % de eosina en tampón pH=7 (40 seg).
- 0,2 % de azul B en tampón pH= 7 (40 seg).

3.1.5. Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los receptores AT_{1A} y AT_{1B} de ratón.

Extracción de ARN

Para determinar la expresión de los receptores AT_{1A} y AT_{1B} en el músculo cremastérico, los cremásters se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C . La extracción de ARN total se realizó siguiendo las instrucciones del manual del kit RNeasy minikit.

Una vez obtenido el ARN total se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Technologies, EEUU) detectando el ratio de absorbancia 280/260. A continuación se obtuvo ADNc a partir de ARN mediante la acción de una retrotranscriptasa.

Retrotranscriptasa inversa (RT).

Para la conversión del ARN en ADNc, el ARN se somete a la acción de la enzima retrotranscriptasa inversa. La enzima retrotranscriptasa que se utilizó fue la “MultiScribe™ Reverse Transcriptase” de Applied Biosystems (50 U/μl). La RT se realizó con un kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, EEUU) siguiendo las instrucciones del proveedor.

La mezcla de RT se preparó con los siguientes reactivos:

<i>REACTIVOS</i>	<i>VOLUMEN (2X)</i>
Tampón de RT 10x	18 μl
Mezcla de dinucleótidos 25x	7.2 μl
cebadores 10x	18 μl
Enzima retrotranscriptasa	9 μl
Agua DEPC	37.8 μl

Tabla 5: Reactivos y volúmenes utilizados en la RT para la determinación de la expresión de los receptores AT_{1A} y AT_{1B} en el músculo cremáster de ratón.

Se utilizó el mismo volumen de muestra que de mezcla de RT.

Después las muestras se llevaron al termociclador siguiendo diferentes ciclos que fueron:

- 25°C durante 10 minutos.
- 37°C durante 2 horas.
- 4°C (indefinido).

El ADNc obtenido se guardó a -20°C.

PCR semicuantitativa.

Las reacciones de amplificación se realizaron a partir de las indicaciones suministradas en el kit de PCR GoTaqflexi DNA polimerasa. La composición de la reacción se detalla en la siguiente tabla:

<i>REACTIVOS</i>	<i>VOLUMEN (50 μl)</i>
Tampón para PCR verde 5x	10 μ l
MgCl ₂	2 μ l
Mezcla de nucleótidos PCR	1 μ l
Oligonucleótidos con sentido	1 μ l
Oligonucleótidos anti-sentido	1 μ l
Taq Polimerasa (5U/ μ l)	0,25 μ l
Agua DEPC	32 μ l

Tabla 6: Reactivos y volúmenes utilizados en la PCR para la determinación de la expresión de los receptores AT_{1A} y AT_{1B} en el músculo cremáster de ratón.

La solución de cada oligonucleótido específico utilizado en cada reacción (cebadores), se preparó a una concentración 50 μ M. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l, a partir de 2 μ l de ADNc procedente de la reacción de retrotranscripción, en un termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, Madrid, España).

<i>Gen</i>	<i>Oligo-nucleótido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño de producto</i>
AT1 _A	Sentido	5'-GACCAACTCAACCCAGAAAAGC-3'	340 bp
	Anti-sentido	5'-CGAAGCGATCTTACATAGGTG-3'	
AT1 _B	Sentido	5'-GCAGCATTTAGCTAGACAGTTC-3'	488bp
	Anti-sentido	5'-GCCTAGCAAATCTTAACACAC-3'	
β -actina	Sentido	5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'	539 bp
	Anti-sentido	5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3'	

Tabla 7: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la PCR de AT_{1A} y AT_{1B}.

El programa de amplificación que se llevó a cabo en el termociclador se muestra en la siguiente tabla:

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	2 minutos	35 ciclos
Desnaturalización	95°C	1 minuto	
Anillamiento	57°C	1 minuto	
Elongación	72°C	1 minuto	
Elongación	72°C	5 minutos	
	4°C	indefinido	

Tabla 8: programa de amplificación por PCR.

Las muestras se guardaron a -20°C.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis a un voltaje constante de 50 V en gel de agarosa 1,5% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio con luz ultravioleta. Para realizar los geles de agarosa se utilizó el tampón TAE (Tampón Tris-Acetato-EDTA) al que se añadió un 5 % (v/v) de bromuro de etidio 10 mg/ml y agarosa al 1,5 %.

Para la cuantificación del ADNc los diferentes receptores se midió la intensidad de las bandas por densitometría empleando el programa Image J (Rasband, WS, National Institutes of Health, Maryland, USA). Sobre las imágenes digitales de 8 bits se seleccionaron las bandas. El programa generó un gráfico de perfil de intensidad, se definió el área de interés y se obtuvieron las medidas de las áreas seleccionadas. Las mediciones se

realizaron por triplicado. La normalización se realizó a partir de la intensidad de las bandas control del gen de la β -actina.

PCR cuantitativa.

Para la PCR cuantitativa, se emplearon los oligonucleótidos ya diseñados por Applied Biosystems (“predevelopment assay reagents”), cuyas referencias se muestran en la siguiente tabla:

<i>Gen</i>	<i>Referencia</i>
AT _{1A}	Mm00616371_m1
AT _{1B}	Mm01701115_m1
GAPDH de ratón	4352339E

Tabla 9: Referencias de los genes utilizados para la PCR cuantitativa de AT_{1A} y AT_{1B}.

Se preparó una mezcla que contenía agua DEPC, los oligonucleótidos de cada gen y la mezcla para PCR (Universal Master Mix, Applied Biosystems, EEUU). La PCR se realizó en un volumen final de 50 μ l que contenía 5 μ l de ADNc, en una placa para PCR de 96 pocillos (MicroAmp™, Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode, Applied Biosystems, EEUU) utilizando 7900HP Fast de Applied Biosystems.

El método empleado para la obtención de datos cuantitativos sobre la expresión relativa del gen fue el método comparativo C_t (método $\Delta\Delta C_t$), tal y como es descrito por los proveedores. El gen elegido como control endógeno fue el de la GAPDH (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa).

3.2. ESTUDIOS REALIZADOS CON CÉLULAS HUMANAS

Todos los estudios realizados con muestras de voluntarios humanos se han llevado a cabo siguiendo los acuerdos obtenidos en la Declaración

de Helsinki, además fueron aprobados por el comité ético institucional del Hospital Clínico Universitario de Valencia, España.

3.2.1. Obtención de extracto acuoso de humo de tabaco (EHT)

Para la obtención del EHT se siguió el método descrito previamente por Edirisinghe et al (2008) y se utilizaron cigarrillos normalizados sin filtro (Universidad de Kentucky, 3R4F cigarrillos de investigación). Estos cigarrillos se sometieron a una combustión en una bomba (Harvard, Massachusetts, USA) que permitía burbujear el humo de 1 cigarrillo durante 2 minutos en 10 ml de medio cultivo EGM-2 con penicilina y estreptomicina pero sin FBS ni heparina. A continuación, el extracto se hizo pasar por un filtro con un diámetro de poro de 0,22 μm y se ajustó el pH a 7,4. Posteriormente, para estandarizar las preparaciones se midió la absorbancia a una longitud de onda de 320 nm debiendo presentar una densidad óptica de $0,86 \pm 0,05$ en un espectrofotómetro. Siguiendo este protocolo se obtuvo el EHT al 10%. Este extracto antes de ser utilizado para el tratamiento de los cultivos celulares, se volvió a filtrar en la campana de flujo para evitar posibles contaminaciones. El EHT se utilizó siempre durante los primeros 30 min después de su obtención. Las dosis empleadas inicialmente fueron de 0,1, 0,3, 1 y 3 %.

3.2.2. Obtención de cultivos de células endoteliales humanas

Para la obtención de células endoteliales de arteria o de vena de cordón umbilical humano (HUAECs o HUVECs), se emplearon cordones umbilicales siendo indispensable no haber transcurrido más de 12 horas desde el parto. El cordón se limpió por fuera y por dentro con PBS a 37°C, y se perfundió la vena o la arteria con colagenasa (1 mg/ml a 37°C). Transcurridos 20 minutos, se recogió el contenido, se lavó de nuevo el vaso del cordón con medio (con suero fetal bovino) y se centrifugó a 1100 rpm,

7 minutos a 20°C. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio específico EBM-2 suplementado con EGM-2 y 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células obtenidas se cultivaron en un frasco de cultivo celular de 25 cm², hasta llegar a la confluencia del 95%, posteriormente las células fueron tripsinizadas y cultivadas en las correspondientes placas o frascos de cultivos para realizar cada experimento. Antes de la realización de cada experimento, las células se incubaron durante 16 horas con medio EBM-2 que contenía 1% de FBS, y en estas condiciones también se realizaron las estimulaciones.

3.2.3. Aislamiento de leucocitos mononucleares a partir de sangre periférica.

Los leucocitos mononucleares periféricos humanos (PBMC) se obtuvieron a partir de sangre de voluntarios sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll Hypaque. A la sangre se le añadió 1/3 del volumen total de dextrano 20%. Se esperó durante 40-50 minutos y se recogió la fase superior. A esta fase, se le añadieron 15 ml de HBSS sin calcio ni magnesio y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. A continuación se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 2 ml de HBSS sin calcio y magnesio. Esta solución se hizo resbalar por la pared de unos tubos que contenían 2 ml de Ficoll y se centrifugaron 20 minutos a 1700 rpm. Se recogió la interfase donde se encontraban los mononucleares y se añadieron 6 ml de HBSS. Se centrifugó a 1200 rpm, 10 minutos. El precipitado se lavó 2 veces con 5ml de HBSS y se centrifugó a 1200 rpm, 10 min. Finalmente las células se resuspendieron en 1 ml de HBSS y se contaron en el contador automático.

3.2.4. Estudio de las interacciones leucocito-endotelio bajo condiciones de flujo.

Para este estudio se empleó la técnica de la cámara de flujo porque permite la visualización de la adhesión celular bajo condiciones dinámicas de flujo y permite mimetizar las condiciones fisiológicas. Además, la visualización de los diferentes eventos que suceden en la adhesión celular, pueden ser cuantificados al poder procesar las imágenes detenidamente.

Para ello, se sembraron HUAEC y HUVEC en placas de 35 mm de diámetro recubiertas de fibronectina (concentración 5,5 µg/ml). Una vez alcanzada la confluencia y tras el tratamiento correspondiente de las células, las placas se colocaron en una cámara de flujo paralelo (Dynamic flow assay in a parallel plate flow chamber, GlycoTech flow, EEUU).

El sistema de la cámara de flujo, consiste en una cámara que se acopla a las placas de cultivo de 35 mm de diámetro. Esta cámara tiene tres puntos de inserción. Dos de estos puntos están enfrentados, de modo que se les inserta una goma de silicona y forman un canal cerrado por el que se hace pasar la solución que contiene las células sanguíneas en suspensión o la sangre entera. El tercer punto de inserción se acopla a una bomba de vacío.

De este modo, en la cámara de flujo se crea un canal de flujo sobre la monocapa endotelial, y mediante una bomba de succión se establecen las condiciones experimentales de velocidad de perfusión. Así se consigue un flujo constante de células sanguíneas humanas en suspensión o de sangre entera humana sobre la monocapa de células endoteliales emulando las condiciones humanas de flujo sanguíneo sobre el endotelio.

Para poder visualizar los eventos de adhesión celular, se debe colocar la cámara acoplada a la placa de cultivo, sobre un microscopio invertido de contraste de fases. Las interacciones se visualizan, utilizando un objetivo

20x y un ocular 10x. Las imágenes son grabadas en cintas de vídeo para su posterior análisis.

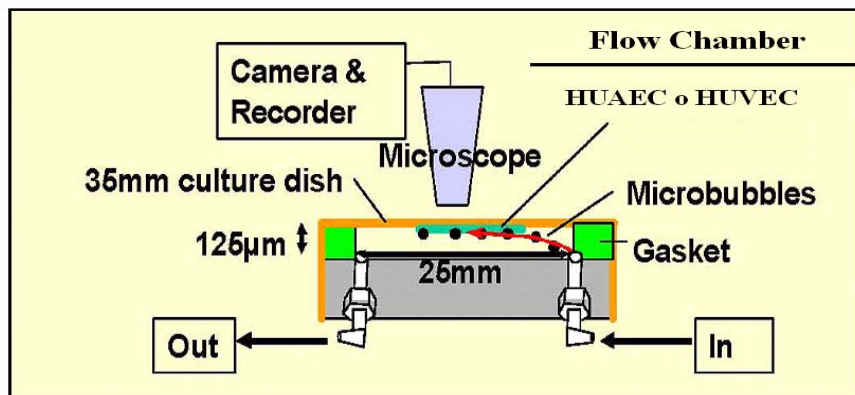


Figura 15: Esquema de la Cámara de Flujo paralelo (Flow Chamber)

Protocolo experimental general de la cámara de flujo

Antes de comenzar cada ensayo se perfundió una solución de HBSS sin calcio y magnesio, atemperada a 37°C, para ajustar el flujo a 0,156 ml/min (que corresponde a un estrés de rozamiento de 1 dina/cm²). A continuación se perfundió la solución de sangre entera humana o la suspensión de las células sanguíneas humanas aisladas en HBSS (con Ca⁺² y Mg⁺²) dependiendo del ensayo que se iba a realizar y se grabaron al menos 5 campos durante 10 segundos cada uno, para poder ser analizados posteriormente. Los leucocitos en fase de rodamiento se identifican fácilmente ya que fluyen más lentamente que el resto de células que fluyen libremente. Aquellos leucocitos que establecen un contacto estable con la monocapa endotelial durante al menos 10 segundos se consideran como adheridos. Se contabilizaron tanto las células en rodamiento, como las células adheridas mientras el medio seguía en perfusión continua.

Para poder medir las interacciones leucocito-HUAEC y leucocito-HUVEC, se hicieron crecer los cultivos celulares de HUAEC y HUVEC en primer pase, hasta la confluencia. Se hizo un lavado con PBS a 37°C, y se

procedió a incubar las células con el medio EBM-2 con factores de crecimiento y FBS 1%. Transcurridas 24 h se aplicaron los diferentes tratamientos.

3.2.4.1. Interacciones leucocito-endotelio en HUAECs y HUVECs estimuladas con EHT.

En este primer estudio, con el fin de estudiar la implicación de FRK en la acumulación leucocitaria inducida por EHT 1%, se estimularon las células HUAEC y HUVEC con EHT 1% durante 24 h. 10 minutos antes de realizar el experimento las células se incubaron con los siguientes tratamientos:

- A. Medio
- B. EHT 1%
- C. EHT 1% + MOPC-21 (5 $\mu\text{g/ml}$)
- D. EHT 1% + anti- CX₃CL1 (5 $\mu\text{g/ml}$).
- E. EHT 1% + anti -VCAM-1 (5 $\mu\text{g/ml}$).
- F. EHT 1% + anti- CX₃CL1 + anti- VCAM-1.

El MOPC-21 (5 $\mu\text{g/ml}$) es un anticuerpo monoclonal empleado como control. Los anticuerpos control y neutralizantes, tanto el anticuerpo monoclonal anti-CX₃CL1 (5 $\mu\text{g/ml}$) que se utilizó para bloquear el dominio extracelular de FRK, como el anticuerpo monoclonal anti-VCAM-1 (5 $\mu\text{g/ml}$) se añadieron 10 minutos antes de colocar la placa en el microscopio y observar las interacciones leucocito-endotelio en la monocapa celular. La suspensión de leucocitos mononucleares (1×10^6 células/ml), aislada por el método estándar separación por centrifugación sobre un gradiente de Ficoll-Paque, se hizo pasar a la velocidad de 0,156 ml/min (1 dina/cm^2) durante 1 minuto y a continuación se observaron 5 campos y se

contabilizaron tanto las células adheridas como las que estaban en fase de rodamiento.

A continuación se llevó a cabo otra serie de experimentos para evaluar la implicación de las MAPK y de NFκB en la acumulación de leucocitos mononucleares inducida por EHT 1% en HUAEC. En este caso, las células HUAEC se pretrataron con un inhibidor específico de ERK1/2 (PD098059) a la concentración de 20 μM, o el inhibidor de p38 MAPK (SB202190) a la concentración de 20 μM, o con MOL294, que es un inhibidor de NF-κB, a la concentración de 2,5 mM. Transcurrida 1 h tras el pretratamiento, las células se estimularon con EHT 1% durante 24 h.

- A. Medio
- B. EHT 1%
- C. EHT 1% + MOL294 (2,5 mM).
- D. EHT 1% + PD098059 (20 μM).
- E. EHT 1% + SB202130 (20 μM).

Transcurridas 24 horas se llevó a cabo el experimento. El mismo día del experimento, se aislaron los leucocitos mononucleares y se preparó una solución (1×10^6 células/ml) que se perfundió sobre la monocapa de HUAEC durante 5 minutos a una presión de 1 dina/cm².

En otra serie de experimentos, con el fin de estudiar la participación de los procesos oxidativos en la acumulación de leucocitos mononucleares al endotelio arterial estimulado con EHT 1%, se procedió a la preincubación de las células con:

- A. Medio
- B. EHT 1%
- C. EHT 1% + Alopurinol (30 mM)
- D. EHT 1% + Apocinina (30 mM)
- E. EHT 1% + SOD (200 UI)

EL alopurinol es un inhibidor enzimático de la Xantina Oxidasa (XO), la apocinina inhibe la NADPH oxidasa y la SOD (Superóxido dismutasa) es una enzima que se encarga de dismutar al anión superóxido. Transcurrida una hora después de haber realizado estos tratamientos, las células fueron estimuladas con EHT 1%. Tras 24 horas de incubación se realizó el experimento. En este experimento, igual que en el anterior, se perfundió la solución de células mononucleares (1×10^6 células/ml) durante 5 minutos a una presión de 1 dina/cm^2 .

3.2.5. Silenciamiento de TNF α en HUAEC mediante transfección con ARN de interferencia.

La transfección de las células endoteliales se llevó a cabo con ARN de interferencia (ARNi) control el cuál no presenta ninguna diana conocida en el genoma humano o con una mezcla de 4 ARN específicos previamente diseñados y validados para el silenciamiento de ARNm de TNF α siguiendo las indicaciones del proveedor. El reactivo de transfección utilizado fue Lipofectamina ARNiMAX. En primer lugar, y con el fin de optimizar las condiciones de transfección, se llevaron a cabo una serie de ensayos iniciales, en los cuales se utilizaron diferentes concentraciones de ARNi y volúmenes del reactivo de transfección de acuerdo con las indicaciones del kit de Lipofectamina ARNiMAX. Para estos ensayos el protocolo fue el siguiente:

Inicialmente, las células se sembraron en frascos de cultivo, cuando alcanzaron la confluencia se tripsinizaron y se sembraron en placas de 35 mm^2 de diámetro. Tras alcanzar una confluencia del 60- 80 %, una hora antes de la transfección, se lavaron las células con PBS y se añadió $900 \mu\text{l}$ de medio EBM-2 sin suero y sin antibiótico.

Paralelamente, se preparó la mezcla final de la transfección a partir de dos mezclas iniciales (Solución A y Solución B). Para preparar la Solución A se añadió el ARNi (según las proporciones indicadas) a 50 μ l de medio Opti-MEM-I sin suero. La Solución B se preparó añadiendo la Lipofectamina (según las proporciones indicadas) a 50 μ l de medio Opti-MEM-I sin suero. Tanto la Solución A como la Solución B se incubaron por separado durante 5 min a temperatura ambiente. Tras este periodo, se mezclaron ambas soluciones, y la mezcla final de transfección se incubó durante 20 min a temperatura ambiente para la formación de los complejos Lipofectamina-ARNi. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las mezclas se añadieron a las placas con las células endoteliales y se incubaron durante 5 h a 37°C. Transcurrido este periodo de tiempo, se cambió el medio de transfección por medio EBM-2 suplementado con un 20% de SBF y antibióticos. Finalmente, las células se incubaron durante 24 h a 37°C.

Con el fin de comprobar la eficiencia de transfección, tras las 24 h de incubación, las células se lavaron con PBS y se extrajo el ARNm por el método del Trizol, y se amplificaron mediante RT-PCR cuantitativa (ambos procedimientos están detallados en el apartado 3.1.5 de experimentos realizados con animales).

Tras el análisis de los datos, se seleccionaron las condiciones óptimas de transfección las cuales fueron: una concentración final de ARNi de 50 nM y un volumen de lipofectamina de 2,5 μ l. Con estas proporciones, se observó un 80 % menos de expresión de los niveles de ARNm de TNF α en las células transfectadas con ARNi para TNF α con respecto a las células transfectadas con ARNi control (los resultados se muestran en la Figura 36).

En los sucesivos estudios de transfección se siguió un procedimiento similar al anterior, pero se utilizaron únicamente las proporciones óptimas

de lipofectamina (2,5 µl) y de ARNi (50 nM). Para los estudios de citometría de flujo y de cámara de flujo las células fueron incubadas con los diferentes tratamientos 24 h después de ser transfectadas.

De este modo, 24 h después de haber realizado la transfección, las células HUAEC se lavaron y se preincubaron con EHT 1% durante 24 h más. Posteriormente se aislaron leucocitos mononucleares y se llevó a cabo el experimento en la cámara de flujo. Los tratamientos se llevaron a cabo tanto en las placas control como en las que el ARNm de TNF α había sido silenciado. Los tratamientos fueron los siguientes:

- A. Medio (control).
- B. EHT 1% (control).
- C. Medio (células con TNF α silenciado).
- D. EHT 1% (células con TNF α silenciado).

Con estas células se realizaron experimentos tanto de cámara de flujo como de citometría de flujo.

3.2.6. Estudios realizados con citometría de flujo

3.2.6.1. Determinación de la expresión del receptor de FRK (CX₃CR1) en sangre entera de voluntarios sanos y pacientes EPOC

Preparación de las muestras y protocolo experimental.

En este estudio se pretendía evaluar la expresión de CX₃CR1 en leucocitos mononucleares humanos, tanto monocitos como linfocitos. En nuestro estudio se definió la población en estudio, trazando como criterios de inclusión de los sujetos controles sanos el ser varón y no fumador mientras que los pacientes EPOC debían ser varones, y presentar una

espirometria obstructiva definida con un cociente entre el volumen de gas espirado durante el primer segundo de la espiración (*forced expiratory volume*, FEV₁) y el volumen total espirado (*forced vital capacity*, FVC)] < 70%. La gravedad de la EPOC se estimó mediante el valor del FEV₁, considerando para el estudio aquellos pacientes cuyo cociente FEV₁/FVC fuera < 70% y el FEV₁ < 30% (EPOC grave). Así se llevo a cabo el estudio con 21 hombres que padecían EPOC y 15 controles sanos.

Para ello, se recolectó la sangre entera fresca de voluntarios sanos y de los pacientes EPOC y se siguió el siguiente protocolo: A las muestras de sangre (40 µl) se les añadió 4 µl del anticuerpo monoclonal frente a CX₃CR1 humano marcado con FITC (clon 528728, IgG₁) y se incubaron durante 30-45 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante, es decir, a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación se lisaron los eritrocitos y se fijaron las muestras utilizando el sistema automático Epics Q-Prep (Coulter Electronics, EEUU) y se analizaron posteriormente en el citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences, EEUU) identificando las diferentes poblaciones leucocitarias por su tamaño (FS) y granularidad (SS) para poder determinar la media de la intensidad de fluorescencia en cada una de ellas.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- A. Control + salino.
- B. Control + anticuerpo anti- CX₃CR1.
- C. Sangre de EPOC + salino.
- D. Sangre de EPOC + anticuerpo anti- CX₃CR1.

En el histograma que muestra FS frente a SS, se seleccionó la población monocítica y linfocítica para determinar la expresión del receptor de FRK en la misma y el porcentaje de células que lo expresaban.

3.2.6.2. Determinación de la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC estimuladas con EHT.

Preparación de las muestras.

Para determinar los niveles de expresión de FRK tanto en HUAEC como en HUVEC se siguió el siguiente protocolo: cuando el cultivo fue confluyente, las células se lavaron con PBS estéril y se les añadió medio EBM-2 con un 1% de FBS. Transcurridas 24 horas, se volvió a cambiar el medio y se trataron con distintas concentraciones de EHT (0,1%, 0,3%, 1%, 3%).

Para ello, una vez transcurrido el periodo de incubación con el estímulo (EHT, 24 h) se recogieron las células con una solución fría de PBS-EDTA 2 mM, se bloquearon los lugares de unión inespecíficos con PBS-BSA 3% y se añadió el anticuerpo monoclonal frente a FRK humana marcado con ficoeritrina (FE) (clon 51637, IgG₁) (dilución 1:25 en PBS-BSA 0.5 %). Tras 1 h de incubación en oscuridad se fijaron las células en paraformaldehído (PFA) al 2%. Con el fin de detectar la FRK tanto de la superficie celular como del citoplasma, las células se permeabilizaron con una solución de PBS-BSA 0,1% que contenía Triton-X 100 0,1%, y se volvieron a incubar con el anticuerpo anti-CX₃CL1 durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación se centrifugaron, se lavaron con PBS y se fijaron con PFA 2%. Las células se resuspendieron en PBS y se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences, EEUU).

Protocolo experimental

En primer lugar, se determinó la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC estimuladas con diferentes concentraciones de EHT (0,1%, 0,3%,

1% y 3%) durante 24 h, y como control positivo se empleó TNF α (20 ng/ml). Los tratamientos fueron los siguientes:

- A. Medio
- B. EHT 0,1%
- C. EHT 0,3%
- D. EHT 1%
- E. EHT 3%
- F. TNF α (20 ng/ml)

Transcurrido el tiempo de incubación, se siguió el protocolo previamente descrito y se determinó la expresión de FRK por citometría de flujo.

En una segunda serie experimental, antes de estimular con EHT 1% durante 24 h, las células se pretrataron durante 1 hora con MOL 294 (inhibidor de NF κ B), PD098059 (inhibidor de ERK 1/2) y SB202190, (inhibidor de p38-MAPK). Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos:

- A. Control
- B. EHT 1%
- C. EHT 1% + MOL294 (2,5 mM)
- D. EHT 1% + PD098059 (20 μ M)
- E. EHT 1% + SB202190 (20 μ M)

Tras estimular con EHT al 1% durante 24 h, las células se analizaron por citometría de flujo.

En una tercera serie experimental, las células fueron pretratadas con alopurinol (inhibidor de la XO), apocinina (inhibidor de NADPH oxidasa) y SOD. En estos experimentos los tratamientos fueron los siguientes:

- A. Control.
- B. EHT 1%
- C. EHT 1% + Alopurinol (30 mM)
- D. EHT 1% + Apocinina (30 mM)
- E. EHT 1% + SOD (200 UI)

Al igual que en el experimento anterior, una vez transcurrida 1 hora del pretratamiento, las células fueron estimuladas con EHT 1% durante 24 h. Transcurrido este tiempo se determinó la expresión de FRK por citometría de flujo.

En una cuarta serie de experimentos, se silenció la expresión de ARNm de TNF α en las HUAEC, siguiendo el procedimiento que se describió en el punto 3.2.5 de este mismo capítulo. Una vez realizado el silenciamiento se estimularon las células con EHT 1% durante 24 h siguiendo estos tratamientos:

- A. Medio (control).
- B. EHT 1% (control).
- C. Medio (células con ARNm de TNF α silenciado).
- D. EHT 1% (células con ARNm de TNF α silenciado).

Finalmente a las 24 h se determinó la expresión de FRK por citometría flujo, siguiendo el mismo protocolo que en los experimentos anteriores.

3.2.7. Estudio de la expresión de FRK en HUVEC y HUAEC mediante inmunofluorescencia indirecta.

La inmunofluorescencia es una técnica ampliamente utilizada en la detección de proteínas. Para ello se emplean anticuerpos preparados frente a la proteína que se desea detectar marcados con moléculas fluorescentes. Así podemos detectar la unión del anticuerpo con el antígeno de la proteína en estudio por la fluorescencia emitida, que se observa mediante microscopía de fluorescencia.

Preparación de las muestras y protocolo experimental.

Las células endoteliales, se incubaron en pocillos de placas de cultivo celular Lab-teck (NUNC, Termo Fisher Scientific, EEUU), donde se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. Seguidamente, se estimularon con EHT 1% y TNF α (20 ng/ml) durante 24 h. El TNF α se empleó como control positivo. Posteriormente se lavaron con PBS y se fijaron con metanol/acetona (50% v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con la solución de PBS-BSA 1% con Triton-X100 0,1% durante 1 h para bloquear los lugares de unión inespecífica y permeabilizar las células. Seguidamente, se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios frente a FRK (dilución 1:200) diluido en una solución de PBS-BSA al 0,1%. Al día siguiente se realizaron los lavados de las preparaciones para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 diluido 1/1000 en PBS-BSA 0,1%. Posteriormente, se realizaron los lavados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.

Por otra parte, para poder visualizar los núcleos celulares se utilizó 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) dilución 1/100 que es un colorante fluorescente que se une fuertemente al ADN. Las fotomicrografías se

tomaron con un microscopio de fluorescencia. En ambos protocolos experimentales que hemos realizado, se tomaron las fotografías de las células endoteliales con la cámara digital Olympus CAMEDIA-C5060 acoplada a un microscopio Axiolab.

En todos los experimentos de inmunofluorescencia, se realizaron controles, para ello se siguieron los mismos pasos descritos exceptuando la incubación con el anticuerpo primario, confirmando así que la tinción observada era específica y no se debía al fondo producido por la fluorescencia del anticuerpo secundario unido inespecíficamente. En cada experimento las fotomicrografías de las preparaciones se captaron en las mismas condiciones de tiempo y ganancia.

3.2.8. Estudio de la expresión de FRK (CX₃CL1) mediante Western Blot.

Para la determinación de CX₃CL1 en HUAEC y HUVEC se utilizó la técnica de Western Blot. El Western Blot es una técnica utilizada para la determinación de proteínas. La especificidad de la unión antígeno–anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de material proteico.

Se utiliza como criterio de identificación positivo de una proteína específica y para obtener datos cualitativos y cuantitativos sobre la misma, ya que podemos realizar posteriormente el análisis densitométrico de las señales registradas.

Preparación de las muestras y protocolo experimental

Para determinar el efecto de EHT sobre la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC, éstas se cultivaron en frascos de 75cm³ y cuando

alcanzaron la confluencia se estimularon durante 24 h con EHT 1% y con TNF α . Los tratamientos fueron:

- A. Medio
- B. EHT 1%
- C. TNF α (20 ng/ml)

Una vez transcurridas las 24 h de estimulación, las células fueron lavadas, y se les añadió una solución RIPA para extraer las proteínas, que contiene Tris-HCl como neutralizante para prevenir la desnaturalización de las mismas, el detergente no iónico NP-40, NaCl para prevenir la agregación no específica de la proteína, y el detergente iónico Nadesoxicolato, para extraer las proteínas. Además a esta solución se añadió una mezcla de inhibidores de diferentes proteasas (Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo que es un inhibidor de serinproteasas. Con la ayuda de un raspador las células se separaron y se recogieron. A continuación se centrifugaron a 45.000 g a 4°C durante 10 min para obtener la totalidad del extracto celular. El contenido proteico se cuantificó, por el método de Bradford (Bio-Rad, Madrid, España). Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS, para separar las diferentes proteínas en función de su peso molecular. Posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con la solución de bloqueo TBS-BSA al 3% durante 30 minutos a 37°C y a continuación se incubaron durante la noche, a 4°C, con los anticuerpos correspondientes.

Tras la incubación con el anticuerpo primario de FRK (dilución 1/500) se lavaron las membranas cuatro veces con un tampón de lavado (TBS, 0,2% Tween-20) durante 10 minutos cada vez. Seguidamente se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario: anti-IgG de conejo conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (dilución 1:2000). Por último, se revelaron las

membranas con el reactivo ECL en el que se produce una banda coloreada al añadir el sustrato para la enzima peroxidasa de rábano, y se fotografiaron utilizando una cámara LAS3000 FUJI (Fujifilm, Japón).

Para comprobar que la cantidad de proteína era la misma en cada muestra, utilizamos un control de carga interno. Así, al finalizar el revelado de las membranas, se realizó el estripeado de la membrana con la solución comercial específica Restore Western Blot Stripping Buffer, y se incubó de nuevo con la solución de bloqueo, para seguidamente incubar la membrana con el anticuerpo monoclonal frente a β -actina humana, producido en conejo (dilución 1:1000), durante 1 h a 37°C. Tras realizar cuatro lavados con la solución de lavado, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo (dilución 1:2000), durante 1 h a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados con la solución de lavado se reveló siguiendo el mismo procedimiento que con el anticuerpo anterior.

Para la cuantificación de la proteína se midió la intensidad de las bandas por densitometría empleando el programa Image J (Rasband, WS, National Institutes of Health, EEUU). Sobre las imágenes digitales de 8 bits se seleccionaron las bandas. El programa generó un gráfico de perfil de intensidad, se definió el área de interés y se obtuvieron las medidas de las áreas seleccionadas.

Las mediciones se realizaron por triplicado. La normalización se realizó a partir de la intensidad de las bandas de β -actina.

3.2.9. Estudios realizados mediante PCR.

3.2.9.1. Estudio de la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC.

Extracción de ARN.

En este estudio, con el fin de determinar la expresión de ARNm de FRK en las células endoteliales de arteria y de vena de cordón umbilical humano, las células se cultivaron y se pretrataron con diferentes concentraciones de EHT (0,1%, 0,3%, 1% y 3%) o TNF α 20 ng/ml durante 1 o 4 horas. Transcurrido ese tiempo se lavaron las células y se les añadió TRIZOL para lisar las células y poder proceder a extraer el ARN. La extracción de ARN total se hizo siguiendo el protocolo de extracción de ARN con TRIZOL según las instrucciones del fabricante.

Retrotranscriptasa inversa (RT).

Para la conversión del ARN en ADNc, el ARN se somete a la acción de la enzima retrotranscriptasa inversa. Este proceso se llevó a cabo de manera idéntica al protocolo descrito en el apartado 3.1.5 de experimentación con animales. El ADNc obtenido se guardó a -20°C.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de FRK en HUAEC Y HUVEC.

Para la determinación de la expresión de ARNm de FRK en HUAEC y HUVEC se utilizó la técnica de PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa se llevó a cabo de la misma manera que se explica en el punto 3.1.5.1 de este mismo capítulo. Las referencias de los cebadores utilizados en este caso se muestran en la tabla 10.

<i>Gen</i>	<i>Referencia</i>
FRK	Hs00171086
GAPDH humano	42869E

Tabla 10: Referencias de los genes utilizados para la PCR cuantitativa de FRK.

3.2.9.2. Estudio de la expresión de TNF α en HUAEC.

Con el fin de comprobar el éxito del silenciamiento de ARNm de TNF α , se realizó una RT-PCR semicuantitativa en las células que se había realizado la transfección, tal y como se describe en el apartado 3.2.5 de experimentos realizados con células humanas de materiales y métodos.

Para ello se siguió el mismo procedimiento que se describe en el apartado 3.1.5.1 del apartado de experimentación con animales de materiales y métodos. En este caso se emplearon la mezcla de cebadores y sondas para TNF α y GAPDH humano prediseñadas por Applied Biosystems cuyas referencias se muestran en la siguiente tabla:

<i>Gen</i>	<i>Referencia</i>
TNF α	Hs99999043_m1
GAPDH	42869E

Tabla 11: Referencia de los genes empleados en el ensayo de PCR

3.3. REACTIVOS

Ang-II, Ang-I, CMP 48/80, enalapril, captopril, quimostatina, cromolín (cromoglicato disódico), mepiramina, bromuro de etidio, azul de toluidina, alopurinol, apocinina, SOD, MOPC-21, PD098059, SB202190, el cocktail inhibidor de proteasas, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo y el anticuerpo monoclonal frente a β -actina humana, producido en conejo para western blot fueron comprados a Sigma Chemical Co., Madrid, España. Los oligonucleótidos de los receptores AT_{1A} y AT_{1B} se compraron a Sigma Genosis, Reino Unido. Losartán fue donado por Merck Sharp & Dohme, Madrid, España. El hidrocloreuro de ketamina (Imalgéne®) fue de Merial, Lyon, Francia y la medetomidina (Domtor®) se compró a Pfizer S.A., Madrid, España. El anti-mMCP-4 de ratón fue donado por el Dr. Guo-Ping Shi (Departamento de Medicina, Hospital de Brigham y de

mujeres y Escuela Médica de Harvard, Boston, Massachusetts). El anticuerpo monoclonal frente a la ECA (2E2) y el anti-VCAM-1 (clon 1.G11B1, IgG₁) se compraron a Santa Cruz Biotechnologies, EEUU. El Trizol se compró a Life Technologies Paisley, UK. Las sondas de TaqMan y los reactivos para la RT y la PCR se consiguieron de Applied Biosystems, Morrisville, NC. El anticuerpo Alexa fluor 635 y el slowfade gold antifade reagent se pidieron a Innogenetics, Barcelona, España. El Alexa Fluor 488, el DAPI y el medio Opti-MEM-I sin suero se consiguieron de Molecular Probes Invitrogen, EEUU. El kit para la determinación de Ang-II fue de SPIbio, Montigny, le Bretonneux, Francia. El kit Em-Vision, el DAB, la proteinasa K, el diluyente de proteinasa K y el diluyente de anticuerpo se compraron a Dako Corporation, EEUU. El medio de montaje Entellán se consiguió de Merck, Whitehouse Station, EEUU. El anticuerpo frente a FRK de ratón para inmunohistoquímica y el anticuerpo primario de FRK para western blot se compraron a Peprotech, (Reino Unido) y el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a la enzima peroxidasa de rábano a Cell Signaling Technology, EEUU. El kit RNeasy minikit es de Quiagen, Alemania y el kit de PCR GoTaqflexi DNA polimerasa es de Promega Corporation, EEUU. El Ficoll Hypaque y el reactivo ECL se compraron a GE Healthcare, Amersham, Reino Unido y el HBSS sin calcio ni magnesio, el medio EBM-2 y el PBS a Lonza Ibérica, España. El anticuerpo monoclonal anti-CX₃CL1 utilizado en la cámara de flujo, el anticuerpo monoclonal frente a CX₃CR1 humano marcado con FITC (clon 528728, IgG₁) y el anticuerpo monoclonal frente a FRK humana marcado con ficoeritrina (FE) (clon 51637, IgG₁) se compraron a R&D Systems, EEUU. El MOL294 fue cedido generosamente por el Dr. Michael Kahn, Departamento de Patología, Universidad de Washington, Seattle, EEUU. El ARN de interferencia (ARNi) control y la mezcla de 4 ARN específicos para el silenciamiento de ARNm de TNF α y la solución

Restore Western Blot Stripping Buffer se compraron a Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, EEUU y las placas de cultivo NUNC para inmunofluorescencia a NUNC, Thermo Fisher Scientific, EEUU. El Bradford para la cuantificación de proteínas es de Bio-Rad, Madrid España.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los resultados están expresados como media + error estándar de la media (ESM). Los datos entre grupos se compararon utilizando el análisis de varianza (one way-ANOVA) con una corrección de Newman-Keuls post hoc para comparaciones múltiples. La significancia estadística fue establecida a una $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ECA FRENTE A LA QUIMASA MASTOCITARIA EN LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA INDUCIDA POR ANGIOTENSINA-I.

4.1.1. Efecto de Ang-II, Ang-I y CMP48/80 sobre la interacción leucocito-endotelio en la microcirculación cremastérica del ratón.

La microscopía intravital fue empleada para observar las interacciones leucocito-endotelio en la microcirculación del músculo cremáster de ratón. La exposición a Ang-II durante 4 h produjo un incremento significativo de la adhesión leucocitaria arteriolar (Figura 16A), de la adhesión leucocitaria venular (Figura 16B) y una disminución de la velocidad de rodamiento (Figura 16C). No se observaron cambios en el rodamiento leucocitario; y la migración leucocitaria siguió un patrón de comportamiento semejante al de la adhesión leucocitaria. Para determinar la dosis de Ang-I adecuada para inducir adhesión leucocitaria tanto en vénulas como en arteriolas, se ensayaron distintas dosis de Ang-I, concretamente 1, 10, y 100 nM. Con la dosis de 100 nM, la Ang-I produjo un aumento significativo de la adhesión leucocitaria en arteriolas (Figura 16), efecto que no pudo ser observado con las dosis inferiores. En vénulas post-capilares, la Ang-I (10 y 100 nM) indujo adhesión de leucocitos y el concomitante descenso de la velocidad de rodamiento leucocitario (Figura 16). Estos resultados permitieron seleccionar la dosis óptima de Ang-I para continuar con los experimentos, la cual fue establecida en 100 nM.

Como se mencionó en la introducción, la quimasa es almacenada en los gránulos mastocitarios, y es la principal enzima implicada en la

conversión de Ang-I a Ang-II por las vías alternativas o independientes de la ECA. Por tanto, nos planteamos utilizar el agente desgranulador, compuesto 48/80 (CMP48/80), para inducir la liberación de la quimasa mastocitaria. A las 4 horas de su administración, observamos un aumento significativo de la interacción leucocito-endotelio tanto a nivel arteriolar como venular (Figura 16). Los datos que se muestran en la Tabla 9, indican que los estímulos administrados no produjeron cambios significativos en los parámetros hemodinámicos evaluados (fuerza de cizallamiento arteriolar ó venular; y en el número de leucocitos circulantes).

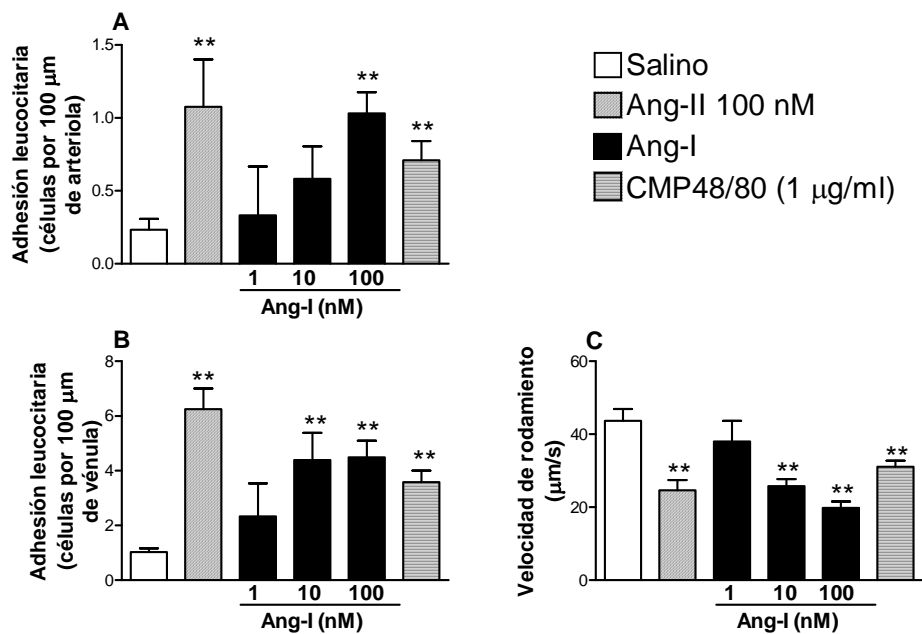


Figura 16: Efecto de la Ang-II, Ang-I y el CMP48/80 sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) en la microcirculación cremastérica. Se evaluó la adhesión y la velocidad de rodamiento leucocitario 4 horas después de administrar por vía intraescrotal una dosis única de Ang-II (100 nM), Ang-I (1, 10 y 100 nM) ó CMP48/80 (1 µg/ml). Como control se utilizó solución salina (100 µl). Los resultados se expresan media±ESM de n=5-9 animales por grupo. **p<0,01 relativo al grupo de salino.

	Tratamiento			
	Salino	Ang-II (100 nM)	Ang-I (100 nM)	CMP 48/80 (1 µg/ml)
<i>Shear rate</i> arteriolar (s ⁻¹)	1138.2±33.5	1088.9±48.5	1126.4±77.1	1193.1±95.7
<i>Shear rate</i> venular (s ⁻¹)	834.8±50.5	784.7±25.3	787.2±67.6	757.4±29.5
Leucocitos circulantes (células/µl)	8973.3±395.2	9042.1±687.3	9864.3±235.5	10416.3±477.4

Tabla 12: Parámetros leucocitarios y hemodinámicos. Se evaluaron 4 horas después de administrar por vía intraescrotal una dosis única de Ang-II (100 nM), Ang-I (100 nM) ó CMP48/80 (1 µg/ml). Como control se utilizó solución salina (100 µl). Los resultados se expresan media±ESM de n=5-9 animales por grupo.

4.1.2. Efecto de losartán, enalapril y quimostatina sobre las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I en la microcirculación cremastérica del ratón.

Para determinar el posible papel de la ECA y de la quimasa mastocitaria en las respuestas leucocitarias inducidas por Ang-I, lo primero que se hizo fue comprobar que los efectos inducidos por este péptido se debían a la generación endógena de Ang-II. En las figuras 17A y 17B se muestra que la adhesión leucocitaria en las arteriolas y en las vénulas postcapilares inducida por Ang-I se mantenía cercana al valor control cuando los animales habían sido previamente tratados con losartán, un antagonista del receptor AT₁ de la Ang-II. De forma similar, la adhesión leucocitaria venular y arteriolar provocada por la Ang-I disminuyó en un 88 y un 73% respectivamente en los animales que fueron pretratados con enalapril, que es un inhibidor de la ECA (Figura 17). En cambio, la adhesión inducida por la Ang-I se mantuvo significativamente aumentada en presencia de la quimostatina (10 mg/kg, i.p.), que es un inhibidor de la quimasa mastocitaria.

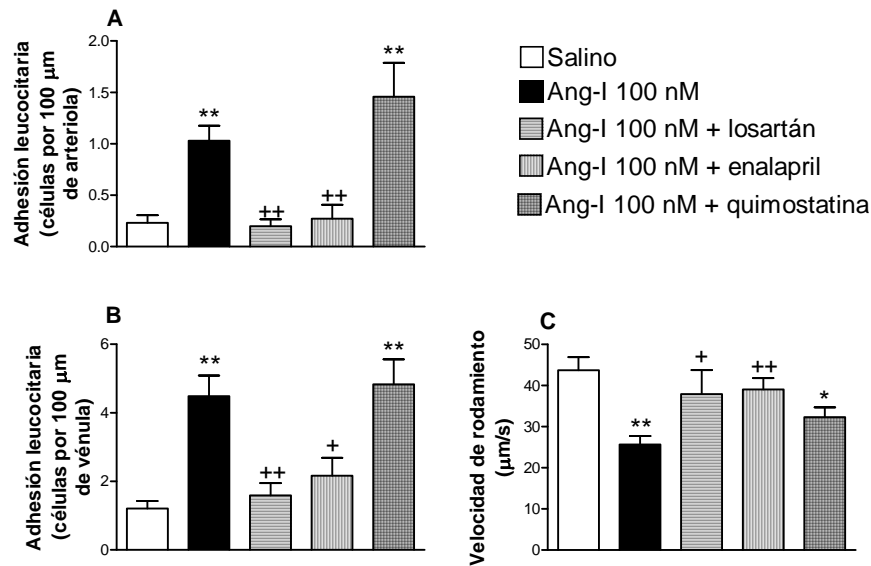


Figura 17: Efecto del losartán, enalapril y quimostatina sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) inducido por Ang-I en la microcirculación cremastérica. Los animales fueron inyectados intraescrotalmente con salino o Ang-I 100 nM. Algunos animales se pretrataron con losartán (10 mg/kg, i.p.), enalapril (30 mg/kg, p.o.) o quimostatina (10 mg/kg, i.p.) 30 min antes de la administración de Ang-I. Los resultados se expresan como la media±ESM de n=5-9 animales por grupo. *p<0,05 o **p<0,01 relativo al grupo de salino; +p<0,05 o ++p<0,01 relativo al grupo de Ang-I.

4.1.3. Efecto de losartán, enalapril, quimostatina y mepiramina sobre la interacción leucocito-endotelio inducida por el CMP48/80 en la microcirculación del músculo cremáster del ratón.

Ya que la quimasa mastocitaria es la principal serín proteasa implicada en la conversión de Ang-I a Ang-II por las vías alternativas o independientes de la ECA, se utilizó el CMP48/80 para producir la degranulación de los mastocitos vasculares y activar la quimasa mastocitaria. En este caso observamos que el losartán y la quimostatina afectaron únicamente la velocidad de rodamiento inducida por el CMP48/80 (Figura 18C), pero la adhesión leucocitaria arteriolar y venular

causadas por el CMP48/80 no fueron significativamente inhibidas por losartan, enalapril, quimostatina o mepiramina (Figuras 18 A y B).

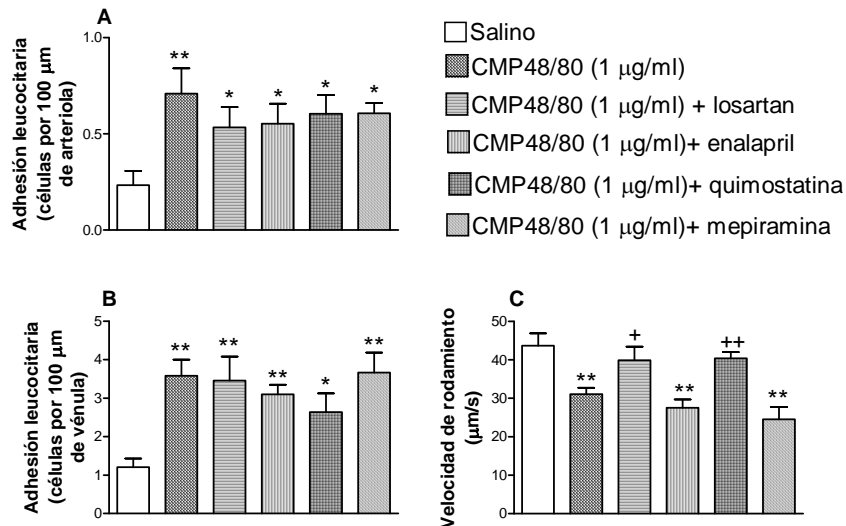


Figura 18: Efecto del losartán, enalapril, quimostatina y mepiramina sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) inducido por CMP48/80 en la microcirculación cremastérica. Los animales fueron inyectados por vía intraescrotal con salino o CMP48/80 (1 µg/ml). Algunos animales fueron pretratados con losartán (10 mg/kg, i.p.), enalapril (30 mg/kg, p.o.), quimostatina (10 mg/kg, i.p.) o mepiramina (3 mg/kg, i.p.) 30 min antes de la administración de CMP48/80. Los resultados se expresan como la media±ESM de n=6-10 animales por grupo: *p<0,05 o **p<0,01 relativo al grupo de salino; +p<0,05 o ++p<0,01 relativo al grupo de CMP48/80.

4.1.4. Efecto de la Ang-I, el CMP48/80 y la combinación Ang-I + CMP48/80 sobre las interacciones leucocito-endotelio en la microcirculación cremastérica del ratón.

A pesar de los resultados obtenidos no se descartó una posible contribución de la quimasa mastocitaria en la generación endógena de Ang-II. Por ello, para comprobar esta hipótesis, se comparó el efecto individual de la Ang-I y el CMP48/80 sobre la adhesión leucocitaria en arteriolas y vénulas, con el efecto combinado de ambos compuestos. La administración combinada de los dos estímulos produjo un aumento significativo de la

adhesión leucocitaria arteriolar y venular, comparado con el efecto observado cuando la Ang-I o el CMP48/80 fueron administrados de forma individual (Figura 19 A y B). Sin embargo, no se observó disminución de la velocidad de rodamiento leucocitario (Figura 19C).

Para confirmar si los mastocitos se habían degranulado, procedimos a realizar la tinción del cremáster “in vivo” con azul de toluidina después de haber realizado las mediciones de los parámetros leucocitarios y hemodinámicos. Efectuamos el recuento de mastocitos del grupo control y tratados, y no observamos diferencias significativas entre los diferentes grupos. Sin embargo, sí observamos mayor número de mastocitos degranulados en aquellos ratones tratados con el CMP48/80 intraescrotalmente (Figura 19 B).

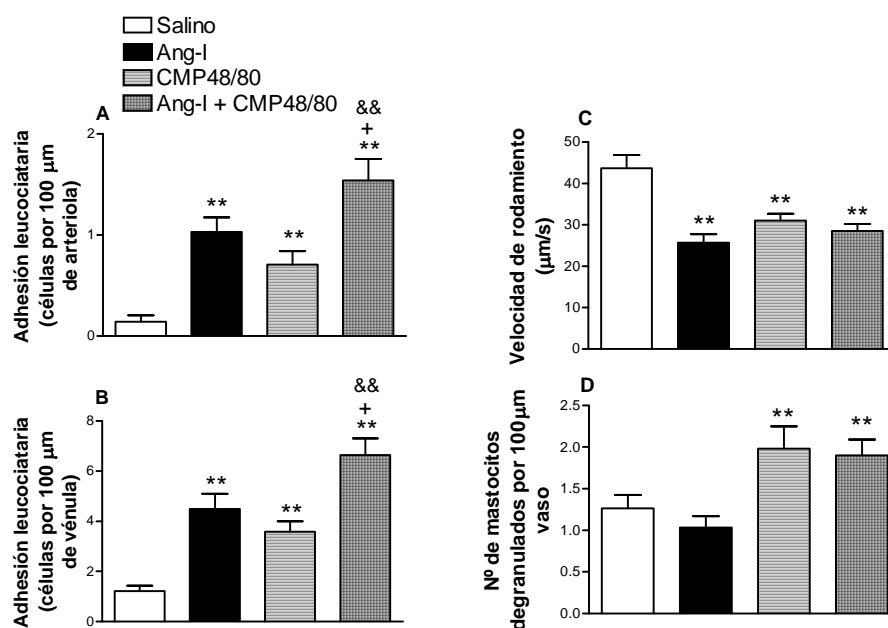


Figura 19: Efecto de la Ang-I, CMP48/80 y Ang-I+CMP48/80 sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), la adhesión leucocitaria venular (B), la velocidad de rodamiento leucocitario (C) y la desgranulación mastocitaria (D) en la microcirculación del cremastérica. Los ratones se trataron con una inyección intraescrotal de salino, Ang-I (100 nM), CMP48/80 1 µg/ml o con la combinación de Ang-I (100 nM) + CMP48/80 (1 µg/ml) y las respuestas se evaluaron 4 horas después de la administración de los diferentes tratamientos. Los resultados se expresan como media±ESM de n=8-10 animales por grupo. **p<0,01 relativo al grupo de salino; +p<0,05 relativo al grupo de Ang-I; &&p<0,01 relativo al grupo de CMP48/80.

A continuación se realizó la inmunohistoquímica del cremáster en los diferentes grupos experimentales de ratones. Mientras que en todos los grupos se observó una clara expresión de la ECA en el endotelio vascular, la degranulación de mastocitos solamente fue evidente en los animales tratados con CMP48/80. La expresión de la quimasa mastocitaria-4 de ratón (mMCP-4) se observó localizada alrededor de la pared vascular (Figura 20).

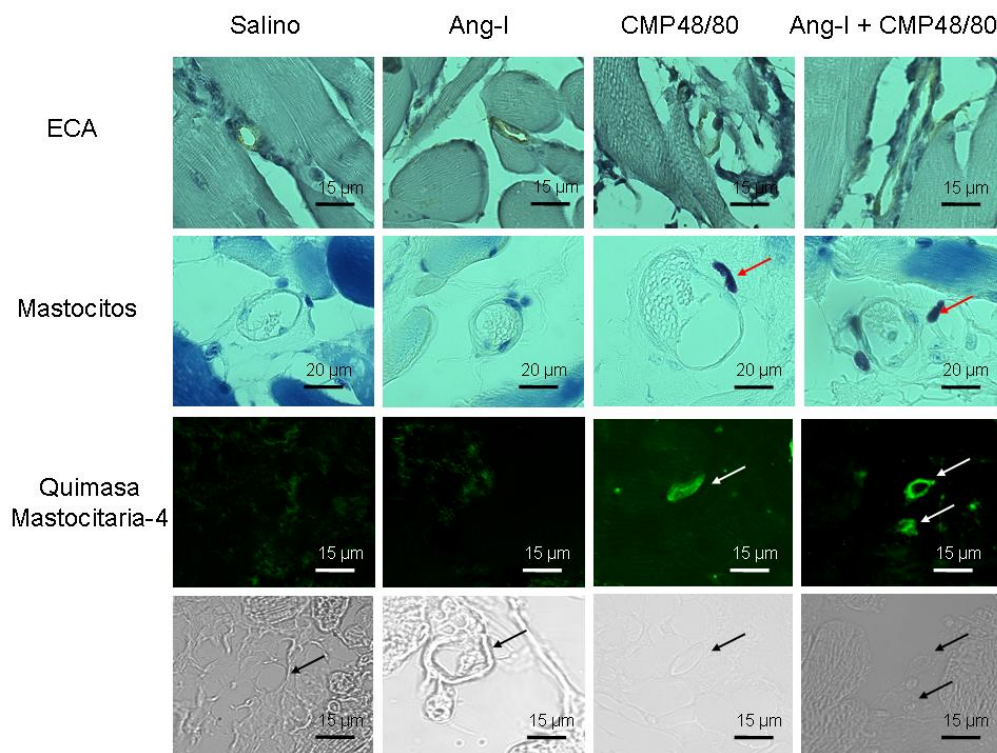


Figura 20: Fotomicrografías representativas que muestran inmunolocalización de la ECA y la mMCP-4 en la microvasculatura del cremáster del ratón. El cremáster se fijó para detección de la ECA, la desgranulación mastocitaria y la mMCP-4 4h después de la administración i.p. de salino, Ang-I, CMP48/80 o Ang-I+CMP48/80. El color marrón de la reacción indica que la localización es inmunoperoxidasa positiva. La fluorescencia verde alrededor del vaso indica expresión de mMCP-4. Los resultados son representativos de n=4-5 experimentos para cada tratamiento.

Por otro lado, no observamos variación en la expresión del receptor AT_{1A} de la Ang-II en los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, en los grupos tratados con Ang-II o con la combinación Ang-I+CMP48/80 se

observó un incremento en la expresión del receptor AT_{1B} de Ang-II, indicando claramente que la combinación de ambos estímulos aumentaba la cantidad de Ang-II generada endógenamente (Figura 21).

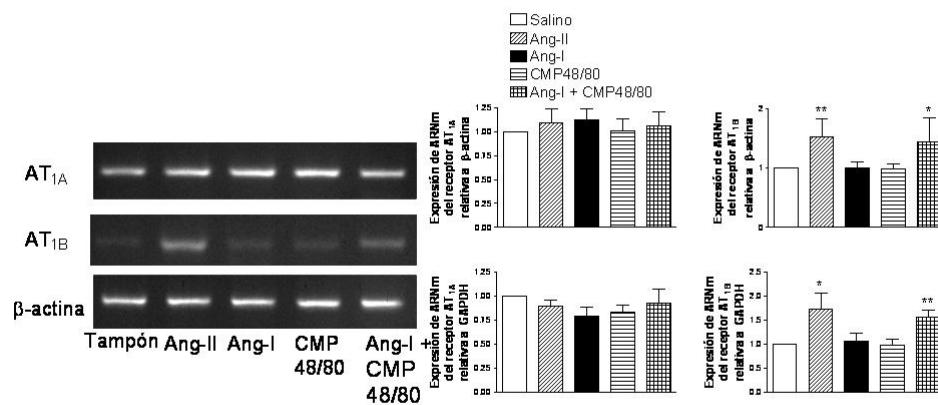


Figura 21: Expresión de ARNm de los receptores AT_{1A} y AT_{1B} en la microcirculación cremastérica del ratón. Las columnas muestran el aumento de expresión del ARNm de AT_{1A} and AT_{1B} relativo al control (β -actina o GAPDH). Los valores se representan como media \pm ESM de n=4-6 experimentos. $p^* < 0,05$ o $p^{**} < 0,01$ relativo a los valores del grupo control.

4.1.5 Medida de la actividad formadora de Ang-II de las vías dependientes e independientes de ECA en el músculo cremáster de ratón in vitro.

Con el fin de cuantificar la Ang-II generada por cada una de las vías y confirmar los resultados anteriormente presentados, se preparó un homogenado de cremáster, y se estudiaron los efectos de captopril (100 μ M), inhibidor de la ECA y la quimostatina (10 μ M) en la generación de Ang-II a partir de Ang-I. Además, con el fin de bloquear ambas vías se utilizó la combinación de ambos inhibidores. Tras la incubación con Ang-I,

se detectó un aumento significativo en la cantidad de Ang-II generada, comparado con el grupo control. Como se muestra en la figura 22, la inhibición de la ECA no afectó significativamente a la producción de Ang-II inducida por la Ang-I. Sin embargo, la quimostatina redujo de forma significativa la generación de Ang-II. La combinación de captopril y quimostatina produjo una disminución en los niveles de Ang-II significativamente superior a la observada con cada inhibidor administrado de forma individual.

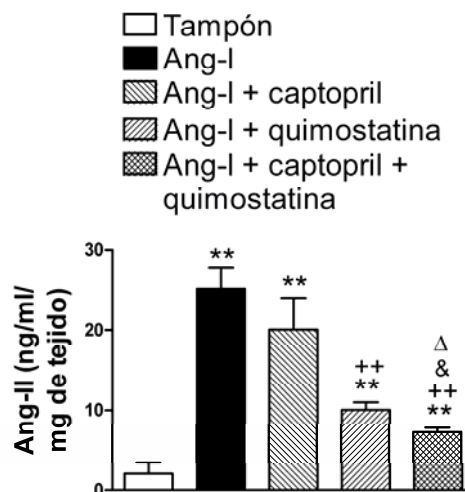


Figura 22: Efecto de captopril, quimostatina y combinación de captopril y quimostatina en la generación de Ang-II a partir de Ang-I en homogenado de cremáster de ratón. El protocolo seguido se describió en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Los resultados se expresan como media±ESM de n=4 cremásters por grupo. **p<0,01 relativo al grupo de salino; ++p<0,01 relativo al grupo de Ang-I, &p<0,05 relativo al grupo de captopril; Δp<0,05 relativo al grupo de quimostatina.

4.1.6. Efecto de losartán, enalapril, quimostatina y de la combinación de enalapril + quimostatina sobre las interacciones leucocito-endotelio inducidas por Ang-I+CMP48/80 en la microcirculación cremastérica del ratón.

En otro grupo de experimentos se estudió la posible contribución de cada enzima formadora de Ang-II mediante la administración intraescrotal de la combinación de Ang-I + CMP48/80. En presencia del losartán se inhibió en un 74% y un 81% la adhesión leucocitaria en arteriolas y vénulas postcapilares inducida por la administración de ambos estímulos (Figura 23 A y B) y revirtió la disminución de velocidad de rodamiento (Figura 23C). Cuando los animales fueron tratados con el enalapril se observó una disminución significativa de la adhesión leucocitaria tanto en arteriolas como en vénulas y un aumento de la velocidad de rodamiento leucocitario (Figura 23). Sin embargo, la administración de quimostatina no afectó de forma significativa a la adhesión leucocitaria inducida por la combinación de estímulos (Figura 23A y B), pero sí que revirtió la disminución de la velocidad de rodamiento (Figura 23C). Por último, cuando se coadministraron los inhibidores de ambas enzimas, la adhesión arteriolar y venular inducida por Ang-I+CMP48/80 se redujo en un 62 y 66% respectivamente y la velocidad de rodamiento leucocitario alcanzó el mismo nivel obtenido con el losartán (Figura 23).

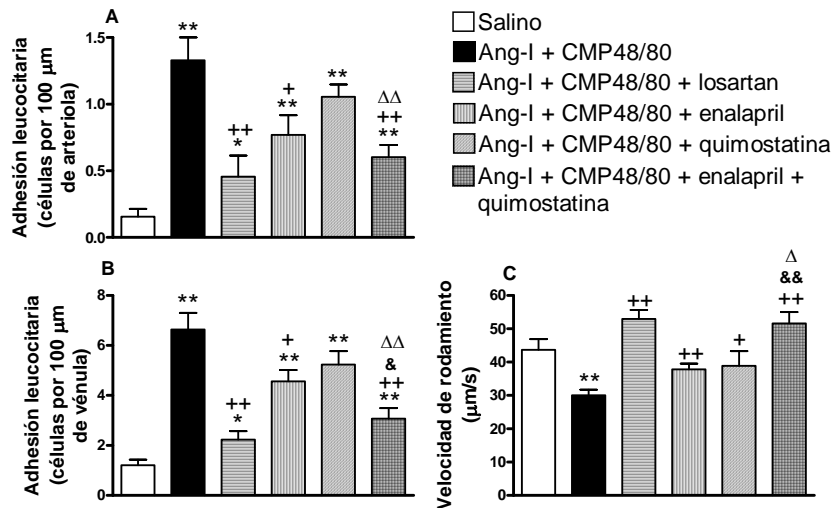


Figura 23: Efecto del losartán, enalapril, quimostatina y de la combinación de enalapril + quimostatina sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) inducido por Ang-I+CMP48/80 en la microcirculación cremastérica. Los animales recibieron una inyección intraescrotal de salino o Ang-I 100 nM + CMP48/80 1 μg/ml. Algunos animales fueron pretratados con losartán (10 mg/kg, i.p.), enalapril (30 mg/kg, p.o.), quimostatina (10 mg/kg, i.p.) o la combinación de ambos inhibidores enzimáticos (enalapril + quimostatina) 30 min antes de la administración de Ang-I+CMP48/80. Los resultados se expresan como la media±ESM de n=8-10 animales por grupo: *p<0,05 o **p<0,01 relativo al grupo de salino; +p<0,05 o ++p<0,01 relativo al grupo de Ang-I + CMP48/80; &p<0,05 o &&p<0,01 relativo al grupo tratado con enalapril; Δp<0,05 o ΔΔp<0,01 relativo al grupo pretratado con quimostatina.

4.1.7. Efecto del cromolín sobre la desgranulación mastocitaria y las interacciones leucocito-Endotelio inducidas por Ang-I+CMP48/80 en la microcirculación cremastérica de ratones salvajes y deficientes en mastocitos.

A partir de estos resultados nos planteamos investigar los efectos de un agente estabilizador de mastocitos sobre las interacciones leucocito-Endotelio inducidas por la combinación de Ang-I+CMP48/80, el cromolín. En primer lugar se demostró que la administración de cromolín disminuía el número de mastocitos degranulados inducido por la combinación de ambos estímulos (Figura 24).

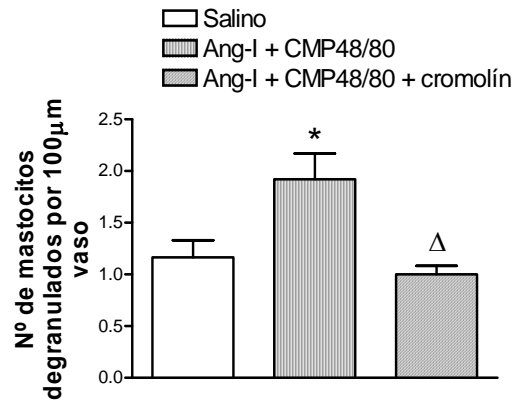


Figura 24: Efecto del cromolín sobre la desgranulación mastocitaria en la microcirculación del cremáster del ratón. Los animales fueron tratados mediante inyección intraescotal con salino, Ang-I (100 nM), CMP48/80 (1 µg/ml) o Ang-I+CMP 48/80. Algunos animales se pretrataron con cromolín (100 mg/kg, i.p.) 30 min antes y 3,5 h después de la administración del estímulo. Los resultados se expresan como media±ESM de n=5-12 animales por grupo. *p<0,05 relativo al grupo de salino; Δp<0,05 relativo al grupo de Ang-I+CMP48/80.

En este caso la administración de cromolín inhibió la adhesión leucocitaria a nivel arteriolar y venular en los ratones salvajes, inducida por la combinación de ambos estímulos en un 88 y 38% respectivamente (Figura 25A y B). Sin embargo, no revirtió el descenso de la velocidad de rodamiento causada por los estímulos (Figura 25C).

En ratones deficientes en mastocitos (WBB6F1/J-Kit^w/Kit^{w-v}), la Ang-I aumentó significativamente la adhesión leucocitaria en arteriolas y vénulas, mientras que con el CMP48/80 no se observaron diferencias en la adhesión con respecto a los controles. La combinación de ambos estímulos incrementó la adhesión leucocitaria en ambos territorios a valores similares a los obtenidos con Ang-I. Sin embargo la combinación de los dos estímulos (Ang-I + CMP4880) con el cromolín, redujo la adhesión en arteriolas pero no en vénulas (Figura 25 A y B). Es importante resaltar que la adhesión leucocitaria inducida por la combinación Ang-I + CMP48/80, fue significativamente mayor en ratones salvajes que en ratones deficientes de mastocitos (Figura 25 A y B).

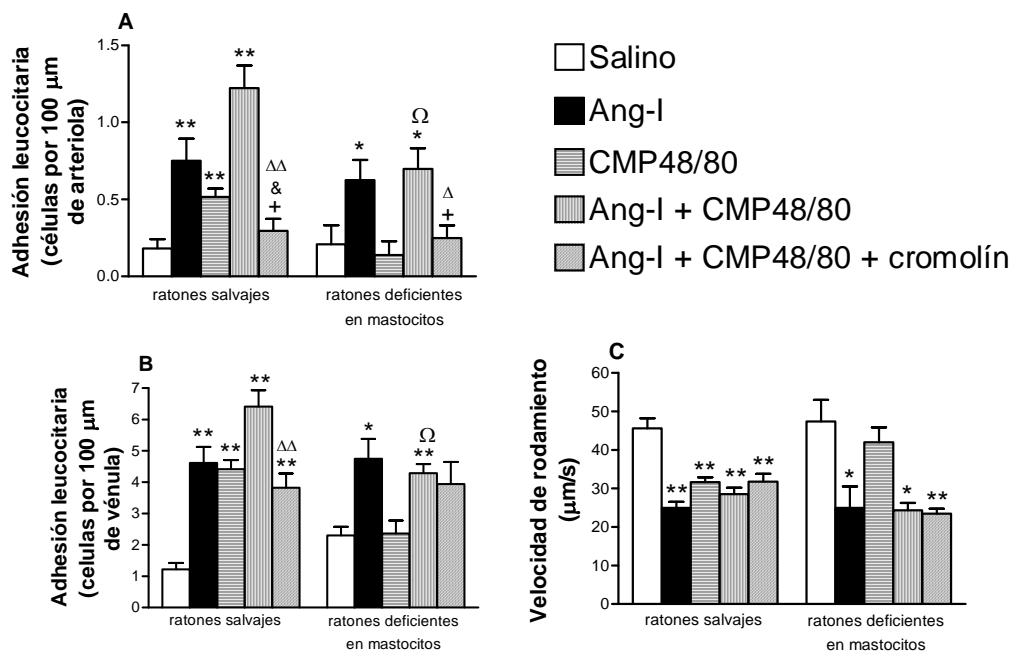


Figura 25: Efecto del cromolín sobre la adhesión leucocitaria arteriolar (A), la adhesión leucocitaria venular (B) y la velocidad de rodamiento leucocitario (C) inducida por Ang-I+CMP48/80 en la microcirculación cremastérica de ratones salvajes y de ratones deficientes en mastocitos. Los animales fueron tratados mediante inyección intraescotal con salino, Ang-I 100 nM, CMP48/80 1 $\mu\text{g/ml}$ o Ang-I+CMP 48/80. Algunos animales se pretrataron con cromolín (100 mg/kg, i.p.) 30 min antes y 3,5 h después de la administración del estímulo. Los resultados se expresan como media \pm ESM de n=5-12 animales por grupo. * $p<0,05$ o ** $p<0,01$ relativo al grupo de salino; + $p<0,05$ relativo al grupo de Ang-I, & $p<0,05$ relativo al grupo de CMP48/80; $\Delta p<0,05$ o $\Delta\Delta p<0,01$ relativo al grupo de Ang-I+CMP48/80; $\Omega p<0,05$ relativo al respectivo tratamiento en los ratones salvajes.

Finalmente, el análisis inmunohistoquímico de la microcirculación cremastérica de los ratones deficientes en mastocitos tratados con la combinación de estímulos mostró la expresión de la ECA en la luz vascular de todos los grupos experimentales (Figura 26), y como se esperaba, no se observó degranulación mastocitaria, ni se detectó expresión de quimasa mastocitaria en animales tratados con CMP48/80 (Figura 26).

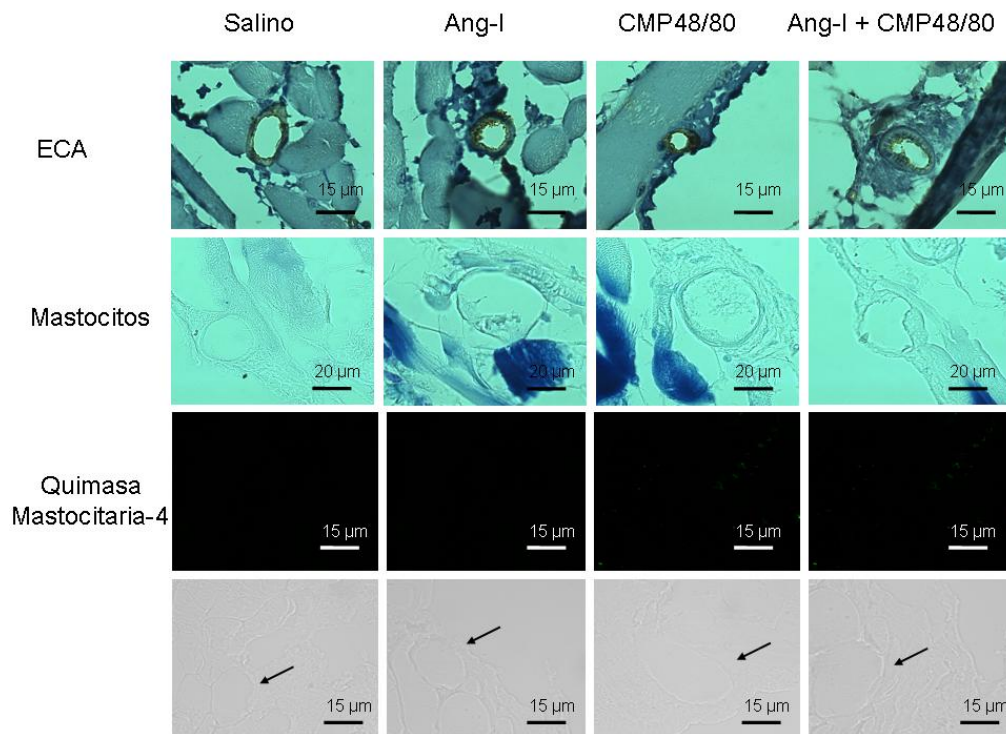


Figura 26: Fotomicrografías representativas que muestran la inmunolocalización de la ECA y de la mMCP-4 en la microvasculatura cremásterica de ratones deficientes en mastocitos (E). Los animales fueron tratados mediante inyección intraescotal de salino, Ang-I 100 nM, CMP48/80 1 $\mu\text{g/ml}$ o Ang-I+CMP 48/80. Se evaluó la expresión de la ECA, la degranulación mastocitaria y la inmunolocalización de mMCP-4 4h después de la inyección de los estímulos. Los resultados son representativos de n= 5-6 experimentos para cada tratamiento.

4.2 PAPEL DE FRK EN LA INFLAMACIÓN VASCULAR CAUSADA POR EL HUMO DE TABACO.

4.2.1. Efecto de la exposición al humo de tabaco sobre la inflamación pulmonar en ratones salvajes (CX₃CR1^{+/+}) y ratones deficientes en el receptor de FRK (CX₃CR1^{-/-}).

Para llevar a cabo estos experimentos, tanto los ratones salvajes como aquellos deficientes en el receptor de FRK, fueron expuestos bien a aire o bien a humo de tabaco. En un grupo de animales, se obtuvo el LBA para realizar el recuento leucocitario diferencial y en otro grupo se aislaron los pulmones y se fijaron en formol para realizar posteriormente estudios histológicos. Hay que destacar que, ni en los ratones carentes de receptor de la FRK ni en los ratones salvajes, la exposición a humo de tabaco produjo variaciones significativas en el número de leucocitos presentes en el LBA comparado con los ratones expuestos a aire (figura 27A). Sin embargo, a nivel tisular, se observó cierta inflamación pulmonar en aquellos ratones que fueron expuestos al humo de tabaco, no detectándose diferencias entre ambos tipos de ratones (figura 27B). Por tanto, la exposición aguda a humo de tabaco causó inflamación pulmonar pero no alteró el número de células en el lavado broncoalveolar (LBA) y, además la presencia o no de receptor de FRK no alteró las respuestas.

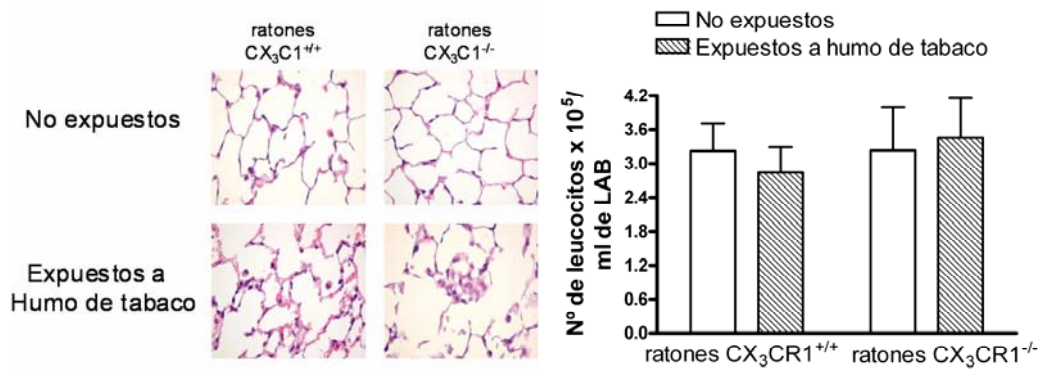


Figura 27: Efecto de la exposición a humo de tabaco sobre la inflamación pulmonar en ratones salvajes ($CX_3CR1^{+/+}$) y ratones deficientes en el receptor de FRK ($CX_3CR1^{-/-}$). Los ratones fueron expuestos a aire o a humo de tabaco durante 3 días y las respuestas fueron evaluadas 16 h después. Los resultados se expresan como media \pm ESM de n=5-11 animales por grupo.

4.2.2. Efecto de la exposición a humo de tabaco sobre las interacciones leucocito-endotelio en la microcirculación cremastérica de ratones salvajes ($CX_3CR1^{+/+}$) y ratones deficientes en el receptor de FRK ($CX_3CR1^{-/-}$).

Por otro lado, se utilizó la microscopía intravital para observar las interacciones leucocito-endotelio inducidas por humo de tabaco en órganos distantes del pulmón, concretamente en la microcirculación cremastérica de ratón. La exposición al humo de tabaco produjo un aumento significativo de la adhesión leucocitaria arteriolar y venular (Figura 28A y C), de la migración leucocitaria (Figura 28D) y una disminución de la velocidad de rodamiento leucocitario (Figura 28B), tanto en los ratones normales como en aquellos deficientes en el receptor de FRK.

Es importante señalar que, mientras ningún parámetro leucocitario fue significativamente diferente entre las dos razas de animales tras exposición o no a humo de tabaco a nivel de vénulas post-capilares (Figura

28), la adhesión arteriolar resultó ser significativamente menor en el grupo $CX_3CR1^{-/-}$ comparado con el grupo control ($CX_3CR1^{+/+}$), observándose una reducción del 38% (Figura 28A).

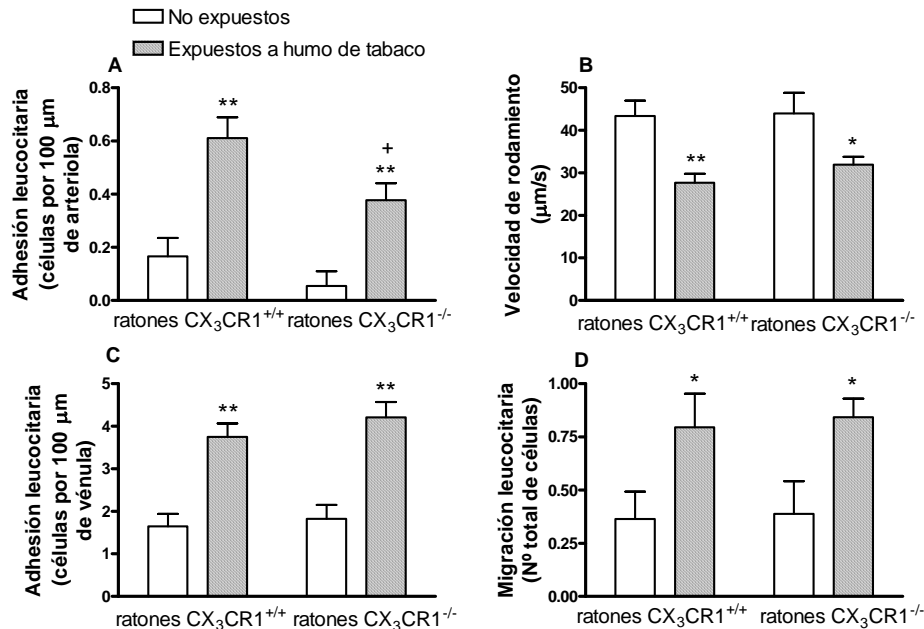


Figura 28: Efecto de la exposición a humo de tabaco sobre las interacciones leucocito-endotelio en la microcirculación cremastérica de ratones salvajes ($CX_3CR1^{+/+}$) y ratones deficientes en el receptor de FRK ($CX_3CR1^{-/-}$). Los ratones fueron expuestos a aire o al humo de tabaco durante 3 días y las respuestas fueron evaluadas 16 h después. Los resultados se expresan como media±ESM de n=5-11 animales por grupo: *p<0,05, **p<0,01 relativo al grupo de animales expuesto a aire. +p<0,05 relativo al grupo de ratones salvajes ($CX_3CR1^{+/+}$).

4.2.3. Estudio histológico de la microcirculación cremastérica de los ratones salvajes ($CX_3CR1^{+/+}$).

Al finalizar el estudio realizado con la microscopía intravital, y con el fin de evaluar la expresión de FRK, se llevaron a cabo los estudios inmunohistoquímicos. Para ello se aislaron y fijaron los músculos cremáster de los distintos grupos experimentales. En estas preparaciones observamos que la exposición al humo de tabaco induce la expresión de

FRK en las arteriolas pero no en las vénulas post-capilares de la microcirculación cremastérica del ratón (Figura 29).

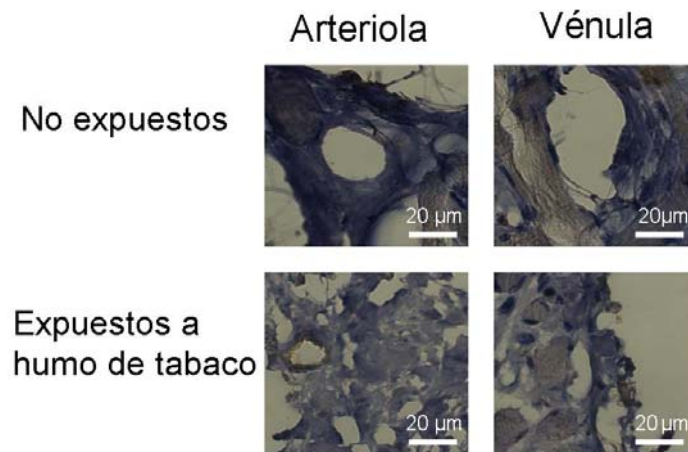


Figura 29: Fotomicrografías representativas del efecto del humo de tabaco sobre la expresión de FRK en la microvasculatura cremastérica de ratones salvajes. Los animales fueron expuestos al humo de tabaco o al aire durante 3 días. Se detectó la expresión de FRK 16 h después de la última exposición. Los resultados son representativos de n= 5-6 experimentos con cada tratamiento.

4.2.4. Efecto del EHT sobre la expresión de ARNm de FRK en HUAEC y HUVEC.

El siguiente objetivo fue evaluar el efecto del EHT sobre la expresión de FRK en las células endoteliales de arteria y de vena humanas. Las HUAEC y HUVEC se incubaron con diferentes concentraciones de EHT (0,1, 0,3, 1 y 3%) durante 1 o 4 horas, como control positivo se empleó TNF α (20 ng/ml). Los resultados obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa (Figura 30) mostraron como tras 1 h de incubación con EHT no se producían cambios en los niveles de ARNm de FRK en HUAEC y HUVEC (Figura 30 A y B), únicamente el TNF α aumentó la expresión de ARNm de esta quimiocina. Sin embargo, cuando las HUAEC se estimularon con EHT durante 4 h, se observó un aumento concentración-

dependiente en la expresión de ARNm de FRK (Figura 30C). El tratamiento de ambos subtipos celulares con $TNF\alpha$ produjo un aumento significativo del ARNm de FRK (Figura 30). En el endotelio venoso la estimulación con EHT a diferentes concentraciones durante 4 h no produjo aumento significativo del ARNm de FRK (Figura 30D).

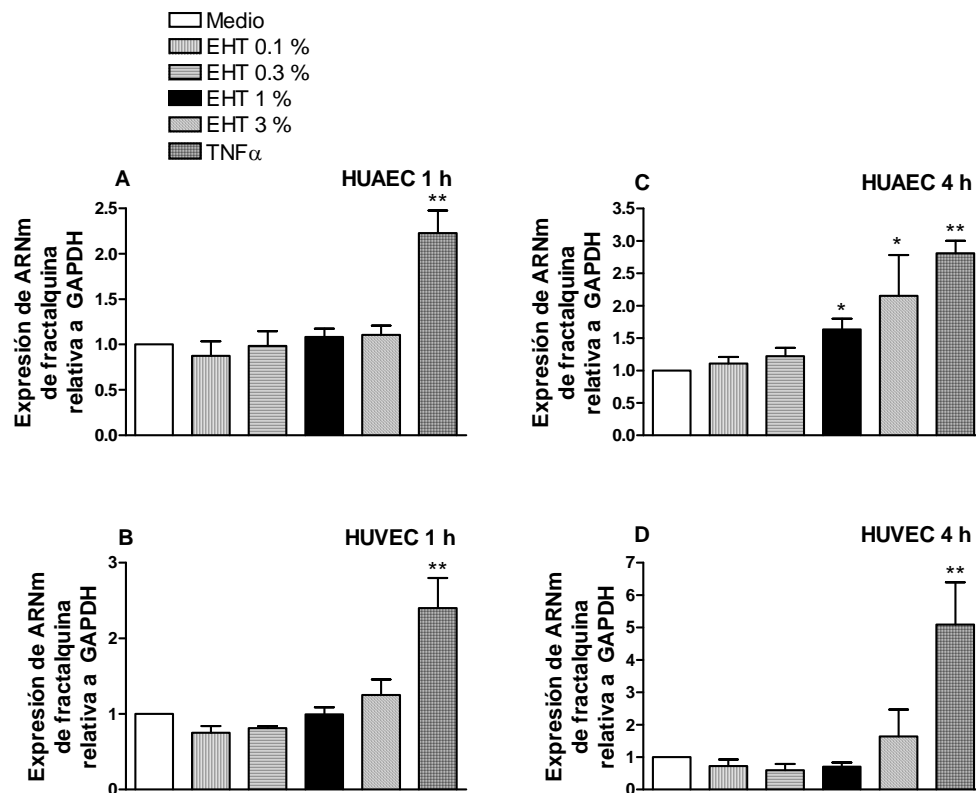


Figura 30: Efecto del EHT (0,1, 0,3, 1 y 3%) y de $TNF\alpha$ (20 ng/ml) sobre la expresión de ARNm de FRK en HUAEC (A y C) y HUVEC (B y D). Las células se estimularon con diferentes concentraciones de EHT o con $TNF\alpha$ (20 ng/ml) durante 1 h (A y B) o 4 h (C y D). Los resultados muestran la expresión del ARNm de FRK relativo al control (GAPDH). Los valores se representan como media \pm ESM de n=5-6 experimentos. $p^* < 0,05$ o $p^{**} < 0,01$ relativo a los valores del grupo control.

4.2.5 Efecto de EHT sobre la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC.

A la vista de los resultados obtenidos, se decidió determinar la expresión de FRK mediante citometría de flujo, western blot e inmunohistoquímica. Para ello, se siguió un protocolo similar al anterior pero en este caso las células fueron estimuladas con EHT (0,1, 0,3, 1 y 3%) durante 24 h. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, confirmaron los resultados previos a nivel de ARNm. En estos ensayos, se detectó expresión de FRK en células endoteliales de arteria pero no de vena (Figura 31 A y B), sugiriendo que esta quimiocina quizás juegue un papel relevante a nivel de inflamación arterial.

A partir de estos resultados se decidió utilizar la concentración de EHT al 1% en el resto de los estudios, ya que producía un aumento de expresión de FRK sin inducir toxicidad celular como se observó con la concentración al 3% de EHT. Posteriormente y con el fin de confirmar estos hallazgos, se realizaron estudios mediante western blot. Para ello, las células fueron incubadas durante 24 horas con EHT al 1%. De nuevo, pudimos observar que la exposición a EHT indujo aumento en la expresión de FRK en el endotelio arterial (Figura 31C), pero no se detectaron cambios en la expresión de la quimiocina sobre el endotelio venoso (Figura 31D).

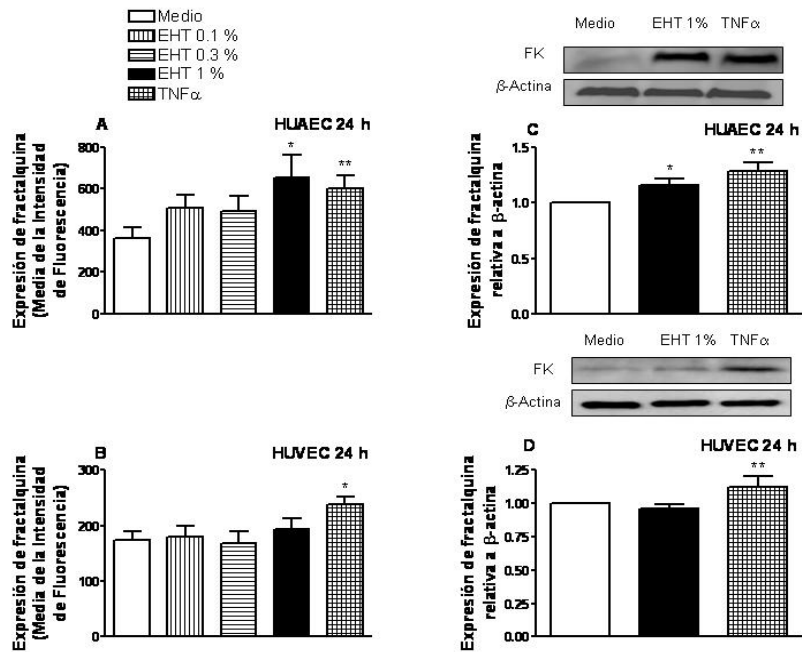


Figura 31: Efecto del EHT sobre la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC. Las HUAEC y HUVEC se estimularon con EHT o con TNF α durante 24 h. La expresión de FRK se determinó mediante citometría de flujo (A y B) y western blot en células incubadas con EHT al 0,1, 0,3 o 1% o con TNF α (20 ng/ml). Los resultados están expresados como la media \pm ESM de 3-6 experimentos independientes. Se muestra el incremento en FRK como la media de intensidad de fluorescencia o respecto al control de carga (β -actina). En la parte superior se muestran geles representativos de western blot. * $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$ relativo a los valores del medio.

Por otra parte, mediante el empleo de técnicas de inmunofluorescencia indirecta se determinó la expresión de FRK en HUAEC y HUVEC. Las fotomicrografías representativas revelaron que el EHT aumentó la expresión de FRK en el endotelio arterial (Figura 32)

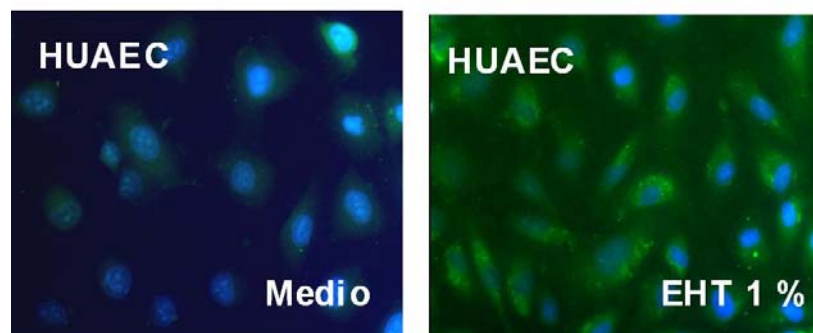


Figura 32: Efecto de EHT 1% sobre la expresión de FRK en HUAEC. Las HUAEC se estimularon con EHT 1% durante 24 horas. Posteriormente se visualizó la expresión de FRK mediante inmunofluorescencia indirecta (color verde). Los núcleos se ven contrastados con DAPI (color azul). Los resultados son representativos de $n=3$ experimentos para cada tratamiento.

4.2.6. Efecto de un anticuerpo frente a FRK sobre la adhesión de leucocitos mononucleares humanos a HUAEC estimuladas con EHT.

Para estudiar las interacciones leucocito-endotelio *in vitro*, iniciamos los estudios con la cámara de flujo, para ello perfundimos leucocitos mononucleares humanos obtenidos de voluntarios sanos a través de una monocapa de HUAEC y de HUVEC estimuladas o no con EHT 1% durante 24 h. Con el fin de evaluar el papel funcional de FRK, 10 min antes de realizar el experimento, algunas placas estimuladas con EHT 1%, se incubaron un anticuerpo irrelevante (MOPC21), con un anticuerpo frente a FRK, con un anticuerpo frente a VCAM-1 o con la combinación de ambos. En la figura 33 se observa el incremento significativo en la adhesión de leucocitos mononucleares a HUAEC y HUVEC estimuladas con EHT. En HUAEC, el bloqueo de FRK, la neutralización de VCAM-1 o la de ambas moléculas disminuyó de forma significativa la adhesión de los leucocitos mononucleares humanos en un 77, 62 y 82% respectivamente (Figura 33A). Por el contrario, la neutralización FRK en HUVEC no afectó significativamente a la adhesión de leucocitos mononucleares (Figura 33B). Aunque el bloqueo de VCAM-1 redujo la adhesión de leucocitos mononucleares al endotelio venular estimulado con EHT, las diferencias no alcanzaron significación estadística (Figura 33B).

Estos resultados parecen sugerir que la expresión de FRK en el endotelio arterial está implicada en la acumulación de leucocitos mononucleares inducida por EHT. Sin embargo, a nivel venular otras moléculas deben intervenir en la adhesión de estos subtipos leucocitarios inducida por el EHT.

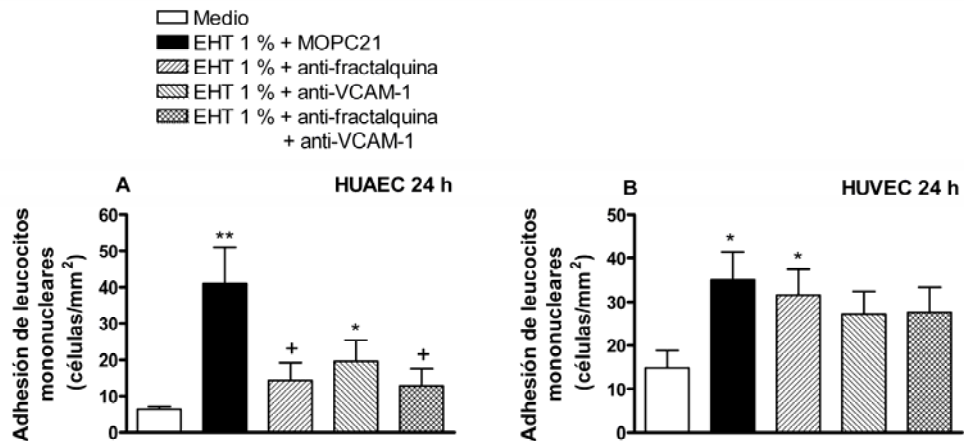


Figura 33: Efecto de un anticuerpo neutralizante de FRK, un anticuerpo neutralizante de VCAM-1 o la coadministración de ambos, sobre la adhesión de leucocitos mononucleares humanos a HUAEC y HUVEC, inducida por EHT. HUAEC y HUVEC se estimularon con EHT 1% durante 24 h. Algunas células se pretrataron con un anticuerpo irrelevante (MOPC21), un anticuerpo frente a FRK, un anticuerpo frente a VCAM-1 o la combinación de ambos, 10 min antes de la perfusión de las células. Los leucocitos mononucleares aislados (1×10^6 células/ml) se perfundieron sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 min, a una presión de 1 dina/cm^2 , y se cuantificó la adhesión leucocitaria. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de $n=6-11$ experimentos. * $p<0,05$ o ** $p<0,01$ relativo a los valores del medio. + $p<0,05$ relativo a los valores del grupo estimulado con EHT 1%.

En conjunto, todos los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que FRK presenta un papel más relevante a nivel de endotelio arteriolar cuando éste ha sido expuesto a EHT. Por tanto, se procedió a profundizar en los mecanismos implicados en estas respuestas.

4.2.7. Efecto de un inhibidor de NF κ B, ERK1/2 y p38 MAPK sobre la expresión de FRK y la adhesión de leucocitos mononucleares humanos inducida por el EHT en HUAEC.

Puesto que el EHT provoca la expresión de FRK en HUAEC, se procedió a investigar el mecanismo de señalización intracelular implicado en la expresión endotelial de FRK y la acumulación de leucocitos mononucleares inducida por EHT.

Para ello, se preincubaron las HUAEC con MOL 294 (2,5 mM) inhibidor de NFκB, PD 098059 (20 μM) inhibidor de ERK1/2 o SB 202130 (20 μM) inhibidor de p38 MAPK, 1 h antes de la estimulación con EHT. En la figura 34 se observa que tanto el inhibidor de NFκB, el inhibidor de ERK1/2 o el inhibidor de p38 MAPK disminuyeron significativamente la expresión de FRK determinada por citometría de flujo en un 64, 81 y 76% respectivamente (Figura 34A); así como la adhesión de leucocitos mononucleares a HUAEC inducida por EHT en un 100, 60 y 57% respectivamente (Figura 34B). Estos resultados parecen indicar que tanto la expresión de FRK como la acumulación de leucocitos mononucleares inducida por EHT depende de la activación de NFκB, ERK 1/2 y p38 MAPK.

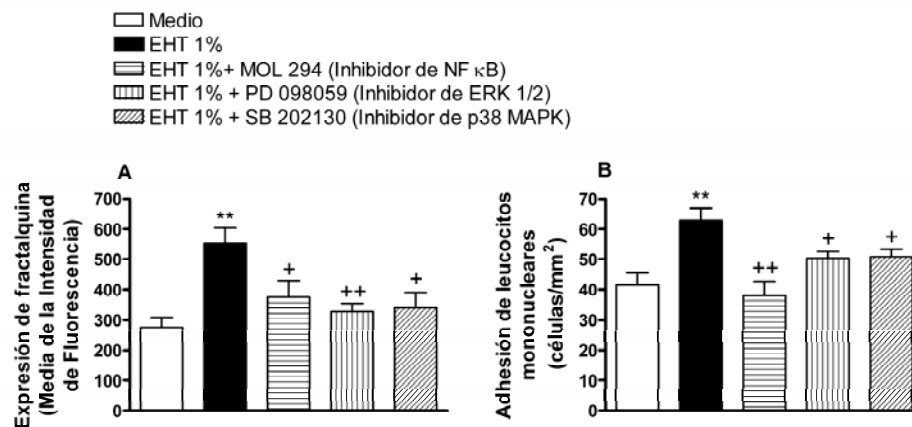


Figura 34: Efecto de un inhibidor de NFκB, ERK1/2 y p38 MAPK sobre la expresión de FRK y la adhesión de leucocitos mononucleares a HUAEC inducida por EHT. Las HUAEC se estimularon con EHT 1% durante 24 h. Algunas células se pretrataron con MOL 294 (2,5 mM), PD 098059 (20 μM) o SB 202130 (20 μM) y se determinó la expresión de FRK mediante citometría de flujo (A). Los resultados están expresados como la media de intensidad de fluorescencia y se presentan como media ± ESM de 6 experimentos independientes. El mismo protocolo se siguió para la determinación de la adhesión de leucocitos mononucleares humanos. Los leucocitos mononucleares aislados (1×10^6 células/ml) se perfundieron sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 min, a una presión de 1 dina/cm^2 , y se cuantificó la adhesión leucocitaria. Los resultados se expresan como la media±ESM de n=5-11 experimentos por grupo: **p<0,01 relativo a los valores del medio. +p<0,05 o ++p<0,01 relativo a los valores del grupo estimulado con EHT 1%.

4.2.8. Efecto de un inhibidor de XO, NADPH oxidasa y SOD sobre la expresión de FRK y la adhesión de leucocitos mononucleares a HUAEC inducida por el EHT.

Estudios previos han demostrado que la producción de ERO y la activación de las rutas de señalización redox-sensibles, median la mayor parte de las acciones inflamatorias de EHT, por ese motivo hemos procedido a estudiar si estas vías de señalización estaban implicadas tanto en la expresión de FRK como en la acumulación de leucocitos mononucleares inducida por EHT.

En primer lugar, las células se pretrataron con alopurinol (30 mM) inhibidor de xantina oxidasa (XO), con apocinina (30 mM), inhibidor de NADPH oxidasa o con SOD 200 UI 1 h antes de la estimulación con EHT 1 %. El análisis por citometría de flujo de las muestras reveló que tanto la apocinina como la SOD disminuyeron la expresión de FRK en HUAEC inducida por EHT de forma significativa en un 81 y 93% respectivamente (Figura 35A). La inhibición de la XO no alteró el aumento de expresión de la quimiocina inducido por EHT.

Paralelamente, los ensayos realizados *in vitro* en cámara de flujo también muestran que tanto apocinina como SOD son capaces de disminuir la adhesión de leucocitos mononucleares humanos a las células arteriales estimuladas con EHT (Figura 35B). De igual manera, la preincubación con alopurinol tampoco indujo cambios en la acumulación de leucocitos mononucleares ocasionada por el EHT (Figura 35B).

De forma que, mientras la NADPH oxidasa y la SOD participan en las respuestas inducidas por EHT, la XO parece no estar implicada en estas respuestas, ya que no afectó de manera significativa ninguno de los parámetros.

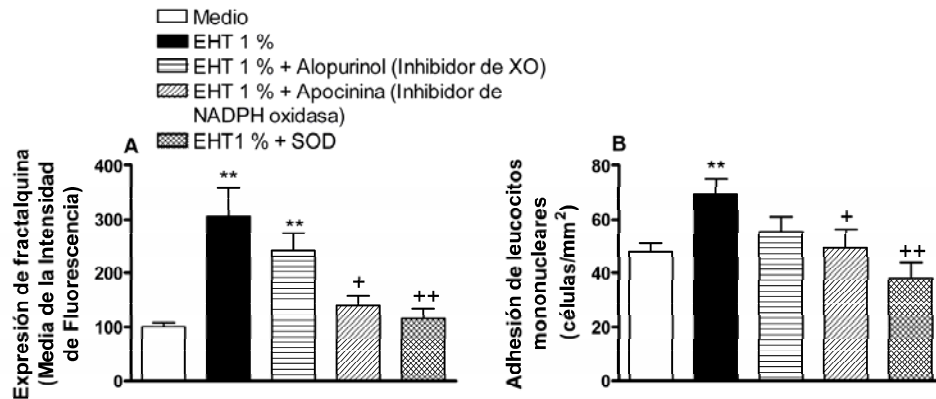


Figura 35: Efecto de alopurinol, apocinina y SOD sobre la expresión de FRK y la acumulación de leucocitos mononucleares a HUAEC inducida por EHT. Las HUAEC se estimularon con EHT 1% durante 24 horas. Algunas células se pretrataron con alopurinol (30 mM), apocinina (30 mM) o SOD (200 UI) y se determinó la expresión de FRK mediante citometría de flujo (A). Los resultados están expresados como la media de intensidad de fluorescencia y se presentan media \pm ESM de $n=6-7$ experimentos independientes. El mismo protocolo se siguió para la determinación de la adhesión de leucocitos mononucleares humanos. Los leucocitos mononucleares aislados (1×10^6 células/ml) se perfundieron sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 min, a una presión de 1 dina/cm^2 , y se cuantificó la adhesión leucocitaria. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de $n=6$ experimentos por grupo: ** $p < 0,01$ relativo a los valores del medio. + $p < 0,05$ o ++ $p < 0,01$ relativo a los valores del grupo estimulado con EHT 1%.

4.2.9. Efecto del silenciamiento de TNF α sobre la expresión de FRK y la acumulación de leucocitos mononucleares a HUAEC inducida por EHT.

En estudios previos se ha comprobado que existen niveles elevados de TNF α en el esputo y biopsias pulmonares de pacientes con EPOC (Keatings et al., 1996; Mueller et al., 1996; Gan et al., 2004) y también se han encontrado incrementos de esta citocina en el suero de fumadores sanos (Petrescu et al., 2010). Además, TNF α es una de las principales citocinas inductoras de la expresión de FRK (Hall et al., 2008; Anh et al., 2004). Por ello procedimos a llevar a cabo una serie de experimentos en los que se silenció la expresión de ARNm de TNF α en HUAEC. De este modo, se transfectaron las células endoteliales con ARN de interferencia control, o

con ARN de interferencia para TNF α . Como se puede observar en la figura 36A, la eficacia de la transfección de HUAEC se confirmó mediante RT-PCR, lográndose una inhibición en los niveles de ARNm de TNF α de un 80%. Los resultados obtenidos muestran como en las células donde se ha silenciado TNF α se detecta una drástica reducción en las respuestas inducidas por EHT tanto en la expresión de FRK (Figura 36B) como en la adhesión de mononucleares humanos a HUAEC, donde se redujo este parámetro en un 83% (Figura 36C).

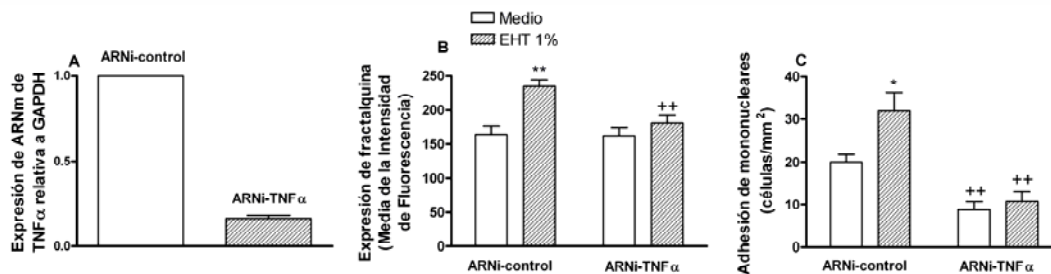


Figura 36: Efecto del silenciamiento de TNF α en la expresión de FRK y la adhesión de leucocitos mononucleares en HUAEC estimuladas con EHT 1%. Las HUAEC se transfectaron con ARNi control o con ARNi de TNF α . La eficacia del silenciamiento de TNF α en HUAEC se determinó por RT-PCR semicuantitativa (A). A las 24 h de la transfección, las células se estimularon con EHT 1 % durante 24 h. Se determinó la expresión de FRK mediante citometría de flujo (B). Los resultados están expresados como la media de intensidad de fluorescencia y se presentan como media \pm ESM de 6 experimentos independientes. El mismo protocolo se siguió para la determinación de la adhesión de leucocitos mononucleares humanos. Los leucocitos mononucleares aislados (1×10^6 células/ml) se perfundieron sobre la monocapa de células endoteliales durante 5 min, a una presión de 1 dina/cm², y se cuantificó la adhesión leucocitaria. Los resultados se muestran como la media \pm ESM de n=6 experimentos independientes. **p<0,01 relativo a los valores del medio. ++p<0,01 relativo a los valores correspondientes en el grupo transfectado con ARNi control.

4.2.10. Expresión del receptor de FRK (CX₃CR1) en monocitos y linfocitos circulantes de individuos sanos no fumadores y pacientes con EPOC.

Se sabe que el estrés oxidativo parece estar implicado en la patogénesis de la EPOC (Lin et al., 2010; Oudijk et al., 2003; Fabri et al.,

2008; Mc Comb et al., 2008). Los resultados obtenidos anteriormente indican que la NADPH oxidasa y la SOD parecen estar involucradas en la expresión de FRK inducida por EHT. Con el fin de averiguar si existía algún efecto sobre la expresión del receptor de FRK (CX₃CR1), se decidió determinar la expresión de este receptor en los monocitos y linfocitos circulantes de pacientes con EPOC y compararlos con la expresión en individuos sanos no fumadores. Mediante citometría de flujo se detectó una expresión del receptor de FRK (CX₃CR1) mayor en pacientes con EPOC comparada con los controles sanos en ambos tipos de células, además también fueron significativas las diferencias en el porcentaje de células que expresaban este receptor (Figura 37).

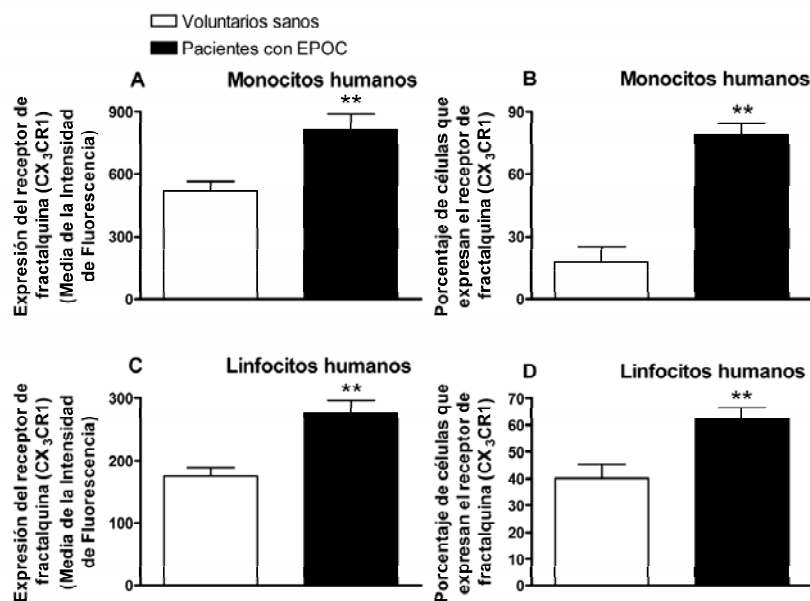


Figura 37: Expresión del receptor de FRK (CX₃CR1) en monocitos y linfocitos circulantes de individuos sanos no fumadores y pacientes con EPOC. La expresión de CX₃CR1 se determinó en sangre entera de voluntarios sanos y pacientes con EPOC mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados como media ± ESM de la media de la intensidad de fluorescencia así como del porcentaje de monocitos y linfocitos circulantes que expresan el receptor (n=15-21 muestras por grupo). **p<0,01 relativo al grupo de voluntarios sanos.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ECA FRENTE A LA QUIMASA MASTOCITARIA EN LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA INDUCIDA POR ANGIOTENSINA-I.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA), cataliza la conversión de Ang-I a Ang-II. Sin embargo, en estudios previos realizados *in vitro* en vasos sanguíneos humanos se observó que cuando se administraba quimostatina, un inhibidor de la quimasa mastocitaria, se atenuaba la respuesta funcional a la Ang-I (Akasu et al., 1998; Kinoshita et al., 1991) y, que los inhibidores de la ECA eran incapaces de bloquear completamente la producción de Ang-II a partir de Ang-I (Richard et al., 2001, Tom et al., 2003, McDonald et al., 2001, Borland et al., 2005; Okunishi et al., 1987). Estos resultados sugerían la existencia de vías alternativas independientes de la ECA, capaces de sintetizar Ang-II a partir de Ang-I en el sistema cardiovascular. Sin embargo, los experimentos *in vitro* no son fisiológicos, ya que la concentración de sustrato utilizada en estos ensayos es bastante más elevada y la Ang-I exógena podía acceder más fácilmente a los mastocitos presentes en la adventicia y en el endotelio. Por ello, como se comentó en la introducción, estos estudios han sido bastante criticados en cuanto al daño producido al extirpar y montar el órgano en el baño, ya que pueden activar los mastocitos permitiendo aumentar la actividad quimasa. Además en la bibliografía existe cierta controversia en cuanto al papel funcional de la quimasa mastocitaria *in vivo* (Jin et al., 2004; McDonald et al., 2001; Takai et al., 2003; Li et al., 2004) y hasta ahora no se ha establecido completamente cuáles de estas vías alternativas es significativa, y su contribución relativa *in vivo*.

En este estudio, se ha demostrado que después de la administración intraescrotal de la Ang-I, las interacciones leucocito-endotelio estaban mediadas principalmente por la Ang-II generada endógenamente, ya que el losartán, antagonista selectivo de los receptores AT₁ de la Ang-II, fue capaz de abolir casi totalmente las respuestas inducidas por este péptido. Además, en ausencia de daño tisular, la producción endógena de Ang-II se debía principalmente a la acción de la ECA, ya que la respuesta inducida por Ang-I se vio reducida cuando se administró el enalapril, pero no cuando se inhibió la quimasa mastocitaria u otras proteasas con la quimostatina.

La quimasa mastocitaria se encuentra almacenada en los gránulos mastocitarios en forma inactiva (Takai et al., 2004, Borland et al., 2005). Esta enzima muestra su actividad enzimática inmediatamente después de su liberación en el tejido intersticial tras estimulación mastocitaria (daño vascular inducido por catéter o injertos de venas) (Jin et al., 2004; Suzuki et al., 1998; Takai et al., 2003). En este estudio, el CMP48/80 produjo adhesión arteriolar e interacciones leucocito-endotelio en las vénulas postcapilares que se acompañaban de un claro aumento en el número de mastocitos degranulados. Estas respuestas parecen ser ampliamente independientes de la acción de Ang-II y podrían ser explicadas por la acción derivada de la liberación de otros mediadores como el factor activador plaquetario (PAF), citoquinas y quimiocinas que se liberan de los mastocitos al administrar CMP48/80 (Gaboury et al., 1995; Sun et al., 2007a, Sun et al., 2007b). Aunque la histamina contribuye al rodamiento leucocitario inducido por CMP48/80 en la microcirculación mesentérica de la rata (Gaboury et al., 1995) debido a la rápida expresión de P-selectina, nosotros, al administrar mepiramina (un inhibidor de los receptores H1 de histamina) no detectamos ningún efecto inhibitorio en la microcirculación cremastérica de ratón, donde la P-selectina se expresa de manera

constitutiva. Por tanto, sugerimos que los efectos del losartán y de la quimostatina sobre la velocidad de rodamiento leucocitario inducido por CMP48/80 se deben probablemente a los efectos de Ang-II sobre la expresión de E-selectina y VCAM-1 (Álvarez et al., 2004; Grafe et al., 1997; Tummala et al., 1999). Por otro lado, la co-administración de Ang-I con CMP48/80 produjo un aumento de las interacciones leucocito-endotelio superior a las respuestas inducidas cuando se administró cada estímulo por separado. En esta situación, ambas enzimas, tanto la quimasa como la ECA, contribuían a las respuestas ya que parecen estar principalmente mediadas por Ang-II.

Ang-II estimula mayoritariamente dos receptores AT_1 y AT_2 . Cuando Ang-II se une a los receptores AT_1 , produce la mayoría de sus efectos fisiológicos, y además puede producir un aumento de la expresión del receptor AT_1 (Wassmann et al., 2006). En los roedores, existen 2 subtipos de receptores AT_1 , el AT_{1A} y el AT_{1B} , que son idénticos en el 95% de la secuencia de aminoácidos (Guimaraes et al., 2005). En este estudio, tanto la Ang-II como la combinación de Ang-I+CMP48/80, pero no la Ang-I, produjeron un aumento en la expresión del ARNm del receptor AT_{1B} , sin afectar al receptor AT_{1A} , apoyando todavía más a la contribución de la quimasa mastocitaria en el aumento de la cantidad de Ang-II generada endógenamente en este modelo. Adicionalmente, las quimasas más expresadas en ratón, al menos en la aorta, son las isoformas 4 y 5, y ambas son eficientes en la conversión de Ang-I a Ang-II (Li et al., 2004; Caughey et al., 2000; Lundquist et al., 2004). En este contexto, la expresión de la quimasa mastocitaria-4 (mMCP-4) se detectó alrededor de los vasos en aquellos animales inyectados o co-inyectados con CMP48/80. Mientras que la expresión de la ECA se restringió al endotelio. Por último, la actividad formadora de Ang-II por ECA y quimasa se detectó en homogenados de cremásters *in vitro*. Sin embargo, en contraste con nuestros resultados que

indican el importante papel de la ECA *in vivo*, la contribución de la quimasa liberada de los mastocitos fue claramente demostrada por su predominancia *in vitro*.

Por otro lado, cuando los animales fueron pretratados con un agente estabilizador de mastocitos, el cromolín, la adhesión leucocitaria inducida por la administración de Ang-I+CMP48/80 se vio reducida. Cabe destacar que este efecto fue mayor en las arteriolas (88% de inhibición) que en las vénulas post-capilares (38% de inhibición). Este hecho podría ser consecuencia de una mayor abundancia de mastocitos periarteriolas que se describió en diferentes tejidos y especies animales incluyendo al ratón (Raud et al., 1989). Debido a que la disminución de la respuesta arteriolar a cromolín fue mayor que la que se consiguió con losartán, procedimos a ensayar el efecto de la combinación Ang-I+CMP48/80 en ratones deficientes en mastocitos WBB6F1/J- Kit^w/Kit^{w-v}. Estos animales contienen una mutación que no afecta ni al número de leucocitos circulantes ni a su función (Li et al, 2004). Mientras que la ECA está presente en la microvasculatura, en estos animales no se detectaron ni mastocitos ni quimasa mastocitaria. La administración intraescrotal de Ang-I+CMP48/80 a estos ratones produjo una reducción significativa de la acumulación leucocitaria comparado con el efecto que se observó en los ratones control salvajes. De hecho, las respuestas observadas fueron similares a aquellas producidas cuando se administraba únicamente Ang-I. Sin embargo, fue interesante observar que, en ausencia de mastocitos cuando se administraba cromolín, la adhesión leucocitaria en vénulas post-capilares inducida por la combinación Ang-I+CMP48/80 no se veía reducida, mientras que a nivel arteriolar se inhibía casi por completo. Por tanto, estos resultados podrían sugerir que el efecto del cromolín en arteriolas podía deberse a una acción más allá de su capacidad estabilizadora de mastocitos, mostrando así un

posible uso potencial en la prevención de la inflamación vascular a nivel arterial.

En conclusión, en ausencia de daño vascular, la ECA endotelial es la principal enzima formadora de Ang-II en la microcirculación in vivo. Sin embargo, en condiciones patológicas, aunque la ECA juega un papel crítico en la acumulación leucocitaria producida por la generación endógena de Ang-II, la liberación de la quimasa matocitaria extravascular puede incrementar la producción de Ang-II y amplificar la respuesta inflamatoria. Además, en contra de los hallazgos descritos in vitro, ni la inhibición de la ECA ni la de la quimasa por separado, fueron particularmente eficaces bloqueando las respuestas inflamatorias inducidas por Ang-II durante la desgranulación mastocitaria in vivo. Sin embargo, la inhibición combinada de ambas enzimas redujo las interacciones leucocito-endotelio hasta niveles similares a los obtenidos con losartán, antagonista del receptor AT₁ de Ang-II. Por tanto, el bloqueo del receptor AT₁ de Ang-II puede representar el mejor tratamiento para prevenir el daño vascular inducido por la Ang-II generada por ambas vías enzimáticas y controlar el desarrollo de la inflamación vascular asociado.

5.2. PAPEL DE FRK EN LA INFLAMACIÓN VASCULAR CAUSADA POR EL HUMO DE TABACO.

La patología cardiovascular es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La relación entre ambas patologías es, entre otros factores de riesgo, el humo de cigarrillo (Maclay et al; 2009). En la EPOC, además de producirse inflamación pulmonar, se ha descrito que existe una disfunción de las vías aéreas y también cierta inflamación vascular sistémica (Shih et al., 2010; Oudijk et al., 2003; Fabbri et al., 2008; Gosker et al., 2009). Ya que la inflamación crónica es un proceso importante en la EPOC, algunos mediadores proinflamatorios como citoquinas (TNF α) y quimiocinas (IL-8, MCP-1, RANTES, etc.) pueden jugar un importante papel en la patogénesis de la EPOC y otras enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis (Oudijk et al; 2003; Anh et al., 2004; Orosz et al., 2007; Gosker et al., 2009; McComb et al., 2008; Donadelli et al., 2003). Por tanto, la identificación de esas quimiocinas en plasma o suero de pacientes EPOC sugiere que la respuesta inflamatoria local comunica vía estos mediadores con la inflamación sistémica y, que la generación prolongada de estos mediadores pueden ser los causantes de los efectos sistémicos en esta patología (Oudijk et al; 2003).

La FRK es la única quimiocina perteneciente a la familia de quimiocinas CX₃C que se encuentra tanto unida a la membrana celular como en forma libre soluble (Dragomir et al., 2008; Umehara et al., 2004). La parte transmembrana de CX₃CL1 actúa como molécula de adhesión que media la captura o adhesión celular mediante la unión a su receptor CX₃CR1, mientras que la forma soluble actúa como molécula quimiotáctica para monocitos, diferentes subtipos de linfocitos T y células NK (Dragomir et al., 2008; Anh et al., 2004; Kasama et al., 2010; Donadelli et al., 2003).

El segundo objetivo de esta Tesis lo ha constituido el estudio de la inflamación vascular inducida por EHT, centrándonos en el papel de FRK, ya que se ha visto que está implicada en diferentes patologías inflamatorias como aterosclerosis, esclerosis, artritis, hepatitis, diabetes, psoriasis, inflamación pulmonar y otras donde el estrés oxidativo y la inflamación juegan un papel importante (Kerfoot et al., 2003; Umehara et al., 2004; Sukkar et al., 2004). Nuestros resultados indican que el humo de tabaco produce inflamación pulmonar y además incrementa las interacciones leucocito-endotelio en el cremaster de ratón, lo que implica una mayor inflamación sistémica. También observamos que el EHT induce expresión de FRK en HUAEC y que tanto NF κ B como ERK1/2 y p38 MAPK parecen estar implicadas en estos efectos, además de la NADPH oxidasa a nivel del estrés oxidativo. El silenciamiento de la respuesta inducida por TNF α redujo tanto la expresión de FRK como la adhesión de leucocitos mononucleares causada por EHT. Finalmente, en pacientes con EPOC se observó una mayor expresión del receptor de FRK (CX₃CR1) en monocitos y linfocitos circulantes.

Numerosos estudios han descrito la existencia de inflamación pulmonar en la EPOC (Oudijk et al; 2003). Además hay evidencias de que el número de neutrófilos presente tanto en la pared bronquial como alveolar está aumentado en pacientes fumadores con moderada EPOC (Mac Nee, 2000). De acuerdo con esto, en el presente trabajo se observó cierta inflamación pulmonar en los ratones expuestos durante tres días a humo de tabaco. Sin embargo, el número total de células leucocitarias en el LBA no se vio afectado. Estos resultados contrastan con estudios previos (Doz *et al.*, 2008; Le Qument *et al.*, 2008) en los que tras exposición aguda (3 días) a humo de tabaco provocaba un aumento del número de neutrófilos en el LBA. Quizás esta discrepancia se podría explicar por diferencias en la forma de exposición. Aunque hemos seguido un modelo semejante al

descrito por estos autores, el humo al que se ven expuestos los animales en nuestro estudio (humo de cigarrillos consecutivos 45s de exposición y 15s de evacuación de humo, frente a la exposición del humo generado por la combustión de dos cigarrillos) sea menor y quizás por ello la agresión pulmonar provocada no genere la extravasación de neutrófilos a la luz bronquial. A pesar de ello, ni en estos estudios ni en el nuestro se hallaron niveles significativamente más elevados de otras poblaciones leucocitarias tras exposición aguda a humo de tabaco. Tampoco se encontraron diferencias en entre la inflamación pulmonar inducida por humo de tabaco en ratones salvajes y ratones deficientes en el receptor de FRK, este resultado es fácilmente explicable ya que al producirse un proceso inflamatorio mayoritariamente neutrofilico, la presencia o no del receptor CX₃CR1 no afectaría a la acumulación de este subtipo leucocitario ya que no expresan este receptor (Ishida et al., 2008; McComb et al., 2008).

A pesar de los hallazgos encontrados a nivel pulmonar, la exposición aguda a humo de tabaco si que produjo un aumento significativo de las interacciones leucocito-endotelio en arteriolas y vénulas de la microcirculación del cremaster de ratón. Además, hemos comprobado que FRK estaba implicada en la adhesión arteriolar, ya que en los ratones salvajes expuestos a humo de tabaco, la expresión de esta quimiocina estaba selectivamente aumentada en el endotelio arteriolar y en los ratones deficientes en el receptor de FRK (CX₃CR1), la adhesión leucocitaria a este nivel se vio significativamente reducida. Por tanto, considerando la interacción leucocito (CX₃CR1)/ endotelio (CX₃CL1) in vivo, FRK parece participar más activamente en la inflamación arteriolar que en la venular inducida por la exposición a humo de tabaco. De hecho, estudios relativamente recientes también han encontrado expresión selectiva de FRK en el endotelio arterial del intestino delgado en respuesta a la

administración intravenosa de TNF, mientras que la expresión en el endotelio venoso fue débil o nula (Ahn *et al.*, 2004).

Estos resultados obtenidos *in vivo* nos llevaron a realizar una serie de estudios *in vitro* en cultivos primarios de células endoteliales humanas. La expresión de FRK (western blot y citometría de flujo) inducida por EHT en cultivos primarios de células endoteliales de origen arterial, aumentó tras 24 horas de exposición al EHT, siendo estas respuestas patentes en el endotelio arterial y prácticamente nulas en el venoso. Estos eventos fueron precedidos del aumento de expresión de ARNm de FRK y, de nuevo en HUAEC pero no en HUVEC. Estos hallazgos muestran la primera diferencia entre HUAEC y HUVEC en respuesta al humo de tabaco.

Por otro lado, se ha demostrado que en condiciones fisiológicas de flujo, la FRK puede mediar una adhesión fuerte, directa y rápida de los leucocitos que expresan CX₃CR1 (Kerfoot *et al.*, 2003). En nuestro estudio, la estimulación con EHT produjo adhesión de leucocitos mononucleares a HUAEC y a HUVEC, pero mientras que la neutralización de la acción de FRK redujo la adhesión de leucocitos mononucleares al endotelio arterial en un 77%, la adhesión al venoso no se vio afectada. Estos resultados confirman la ausencia de FRK en el endotelio venoso expuesto a EHT y podría implicar directamente a esta quimiocina en la inflamación vascular a nivel arterial inducida por la exposición a humo de tabaco.

También se ha demostrado que otras moléculas de adhesión como VCAM-1 están implicadas en la acumulación leucocitaria en aterogénesis y otras patologías inflamatorias (Li *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1993). De acuerdo con esto, nosotros observamos que al bloquear VCAM-1 en células arteriales, la adhesión de mononucleares inducida por EHT, se veía reducida de manera significativa en un 62%, implicando también a VCAM-1 en la adhesión leucocitaria inducida por EHT. En este contexto, la cooperación en condiciones de flujo fisiológico entre FRK y otras MAC

(p.ej. VCAM-1) se ha sugerido como primer mecanismo mediante el cual la FRK acumula leucocitos en enfermedades inflamatorias (Kerfoot et al, 2003; Umehara et al, 2004). En nuestro estudio, la neutralización de ambas actividades (VCAM-1 y FRK) no produjo un aumento significativamente superior a la inhibición que se ocasionó cuando sólo se bloqueó FRK. Este resultado aparentemente contradictorio se podría deber a que el valor de la fuerza de cizallamiento a la que sometimos las células endoteliales era relativamente bajo y no lo suficientemente elevado para observar la adhesión mediada por VCAM-1 (óptima a 10 dinas/cm^2), alejándose de las condiciones de flujo donde la cooperación entre ambas moléculas se observa mejor (Kerfoot et al., 2003). De hecho, la adhesión arterial de leucocitos se suele dar en zonas donde existe enlentecimiento del flujo sanguíneo, normalmente en las curvaturas y las ramificaciones. En conjunto, todos estos datos indican que FRK y su receptor CX₃CR1 mediarían la captura arterial de leucocitos en condiciones de reducido flujo sanguíneo, hecho que suele ir asociado a la mayor predisposición de desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

En cuanto a los mecanismos mediante los cuales el humo de tabaco induce la expresión de FRK, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si el estrés oxidativo jugaba un papel importante en esta expresión, ya que está demostrado que tanto FRK como su receptor se expresan en respuesta al estrés oxidativo (Chandrasekar et al., 2003) y que el humo de tabaco potencia la inducción de una gran variedad de factores redox-sensibles, como el factor de transcripción NFκB o la activación de las MAPK ERK1/2 o p38 (Rajendrasozhan et al., 2008; Park et al., 2010).

El NFκB es un factor de transcripción nuclear redox-sensible que regula la transcripción de genes de mediadores de la inflamación (Mac Nee; 2000, Imaizumi; 2004, Gosker et al., 2009, Oudijk, E-J et al; 2003). La activación de NFκB puede ser directamente dependiente de las ERO o

de la vía de señalización de las MAPK (Dragomir et al., 2008), que son moléculas que contribuyen a la transmisión de señales extracelulares que resultan en la fosforilación de factores de transcripción y alteraciones en la expresión de genes (Donadelli et al., 2003). Estudios previos han demostrado que la vía de NFκB está implicada en la producción de FRK en células endoteliales y células de la musculatura lisa vascular (Chandarsekar et al., 2003; Anh et al., 2004; Donadelli et al., 2003; Sukkar et al., 2004; Dragomir et al., 2008). Nosotros observamos en HUAEC que al bloquear NFκB tanto la expresión de FRK como la adhesión de mononucleares se veía reducida, por lo que NFκB parece también estar implicado en la expresión de FRK y en el proceso inflamatorio del endotelio arteriolar inducido por EHT. Además se ha observado que el EHT media en la fosforilación de p38 y ERK 1/2 regulando así la actividad transcripcional de NFκB (Park et al., 2010) y que en diferentes sistemas celulares la fosforilación de p38 (Goebeler et al., 2001; Donadelli et al., 2003), resulta en la producción de diversas citoquinas, entre ellas la FRK (Donadelli et al., 2003). Nosotros observamos que al inhibir p38 y ERK 1/2 en células estimuladas con EHT, tanto la expresión de FRK como la adhesión de mononucleares al endotelio arteriolar se veía reducida, por lo que estas MAPK también pueden jugar un papel importante en la expresión de FRK y en el proceso inflamatorio inducido por el EHT. En concordancia con nuestros resultados Dragomir y cols. (Dragomir et al., 2008) observaron que niveles de glucosa elevados aumentaban la fosforilación de ERK 1/2 y p38 en células de la musculatura lisa vascular, lo que indicaba que ambas MAPK, tanto p38 como ERK 1/2 participaban en la expresión de FRK inducida por la producción de ERO generados por niveles elevados de glucosa. Resumiendo, nosotros en nuestro estudio hemos demostrado que el EHT aumenta la expresión de FRK y la adhesión de mononucleares en el endotelio arteriolar a través un mecanismo de señalización celular redox-

sensible que implica a las MAPK ERK 1/2 y p38 y al factor de transcripción NFκB.

Por otro lado, el principal mecanismo que conduce a la disfunción endotelial es la generación de anión superóxido que de manera importante modula varias vías de señalización sensibles a ERO y afecta a la expresión de genes y proteínas indispensables para diversas funciones celulares (Dworakowski et al., 2008). De todas las fuentes potenciales de anión superóxido, las NADPH oxidasas (NADPHox) son las únicas cuya función principal es la producción de ERO y cumplen una función especial en la señalización redox (Dworakowski R 2008; Cave AC, 2006; Lambeth JD, 2004; Shih et al. 2010, Lagente et al 2008). Al inhibir la actividad NADPHox inducida por EHT, observamos que tanto los niveles de expresión de FRK como la adhesión de mononucleares en el endotelio arteriolar se veían reducidas, sugiriendo que la producción de ERO inducida por EHT, que incrementa los niveles de FRK y la inflamación vascular, es dependiente de la actividad NADPHox. También está descrito que además de la NADPHox, la XO, el Cp450 y otras fuentes mitocondriales también pueden generar cantidades significativas de superóxido (Orosz et al., 2007). Sin embargo, el papel de estas enzimas en el estrés oxidativo inducido por EHT no es del todo conocido. Si bien es verdad que, en pacientes EPOC si que se ven aumentados los niveles de XO (MacNee et al, 2000) y que, el EHT incrementa la actividad de esta enzima en ratas (Qamar & Sultana, 2010), no hay trabajos que describan como FRK se modula a través de la actividad de XO. Nuestros datos sugieren que la XO no juega un papel importante en el estrés oxidativo inducido por EHT en la expresión de FRK e inflamación vascular, ya que al inhibir esta enzima la expresión de FRK y la adhesión leucocitaria no se vieron reducidas de manera significativa. Por último también hemos demostrado que la eliminación del anión superóxido por acción de la SOD

reduce la expresión de FRK y la adhesión de mononucleares en el endotelio arteriolar inducidas por EHT. Esto ratifica el papel de los ERO en la en la expresión de FRK y la inflamación vascular inducida por EHT que hemos descrito en párrafos anteriores (Figura 38).

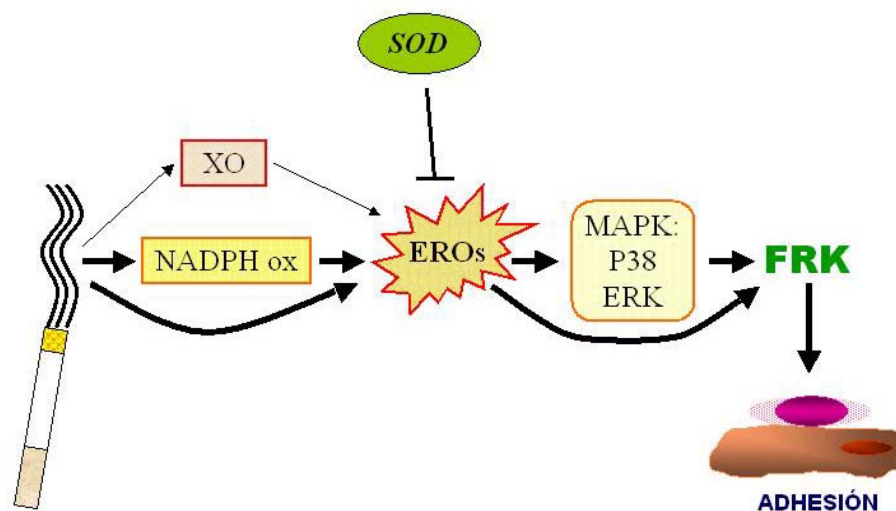


Figura 38: Diagrama esquemático ilustrando los mecanismos redox propuestos implicados en la expresión de FRK inducida por EHT.

Por otro lado, se sabe que el EHT aumenta los niveles de $TNF\alpha$ (Jeong et al., 2010; Mortaz et al., 2009). En estudios previos se ha comprobado que existen niveles elevados de $TNF\alpha$ en el esputo y biopsias pulmonares de pacientes con EPOC (Keatings et al., 1996; Mueller et al., 1996; Gan et al., 2004) y también se han encontrado incrementos de esta citocina en el suero de fumadores sanos (Petrescu et al., 2010). Ya que $TNF\alpha$ es uno de los principales inductores de la expresión de FRK en las células endoteliales humanas (Ahn et al., 2004; Hall et al., 2009), nos propusimos bloquear la expresión de esta citocina con el fin de confirmar si $TNF\alpha$ se encuentra implicado en la expresión de FRK inducida por EHT. Nuestros resultados muestran que el silenciamiento de $TNF\alpha$ reduce la expresión de FRK hasta niveles basales así como la adhesión de mononucleares al endotelio arterial en un 80%. Estos hallazgos parecen

indicar que el EHT, paralelamente a las vías redox, produce un aumento de la expresión de FRK y de la inflamación vascular mediante la síntesis y liberación de $\text{TNF}\alpha$. Se observó también, que en las células en la que el ARNm de $\text{TNF}\alpha$ fue silenciado, la adhesión de mononucleares a HUAEC estaba igualmente disminuida respecto a las células transfectadas con el ARNi control. Aunque no hay estudios que describan que el silenciamiento de $\text{TNF}\alpha$ afecte a las interacciones leucocito-endotelio en ausencia de estímulo, es posible que la expresión constitutiva de algunas MACs dependa de los niveles basales de $\text{TNF}\alpha$. En un estudio reciente, otros autores comprobaron que el silenciamiento de otra citocina inflamatoria, *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), producía una disminución en los niveles de expresión basales de algunas moléculas de adhesión, especialmente ICAM-1, así como de ciertas quimiocinas tales como IL-8 o MCP-1 (Cheng et al., 2010).

Por otro lado, se ha descrito que en pacientes con EPOC existe un aumento de la expresión de ARNm de FRK en el tejido pulmonar (Ning et al., 2004). Adicionalmente se ha observado que en ratones que fueron expuestos crónicamente a humo de cigarrillo aumentaba la expresión génica de FRK en el tejido pulmonar, lo que se relacionó a su vez con una mayor acumulación de células $\text{CX}_3\text{CR1}^+$ en el mismo (incluyendo monocitos/macrófagos) y también con el desarrollo de EPOC (McComb et al., 2008). A lo largo de esta investigación hemos observado que el EHT produce aumento de las interacciones leucocito-endotelio y que FRK participa en estas respuestas. En otras enfermedades que comparten disfunción endotelial e inflamación vascular como esclerosis sistémica (Hasegawa et al., 2005) o la vasculitis sistémica (Bjerkeli et al., 2007) se demostró que en los leucocitos mononucleares de sangre periférica de estos pacientes, la expresión del receptor de FRK ($\text{CX}_3\text{CR1}$) estaba aumentada. Ya que el receptor de FRK ($\text{CX}_3\text{CR1}$) se expresa en monocitos (McComb

et al., 2008, Sukkar et al., 2004) y que la acumulación de monocitos es un evento esencial en la respuesta inflamatoria arterial, decidimos continuar nuestra investigación evaluando la expresión del receptor de FRK, CX₃CR1, en monocitos y linfocitos circulantes de pacientes con EPOC. Nuestros resultados muestran que en sangre periférica de pacientes con EPOC los monocitos y los linfocitos expresan mayores niveles del receptor de FRK (CX₃CR1) que los individuos sanos no fumadores. Estos resultados sugieren que las interacciones entre leucocitos CX₃CR1⁺ y el endotelio que presenta una mayor expresión de FRK (CX₃CL1), como se podría dar en pacientes con EPOC, la inflamación vascular se vería aumentada en comparación con lo que ocurre en individuos sanos no fumadores, aunque estudios funcionales a este nivel se requieren para sustentar dicha afirmación.

Por tanto, podríamos sugerir que el tabaco induce la expresión de FRK, y que tanto FRK como su receptor CX₃CR1 parecen jugar un papel importante en la inflamación sistémica asociada a la EPOC, lo que podría constituir una nueva diana terapéutica en la prevención de la disfunción endotelial que se da en la EPOC.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La exposición a Ang-II, Ang-I ó CMP48/80 aumenta las interacciones leucocito-endotelio *in vivo* en el músculo cremaster de ratón.

2. La ECA endotelial es la principal enzima formadora de Ang-II en la microcirculación *in vivo* y la liberación y activación de la quimasa mastocitaria extravascular parece contribuir a la producción de Ang-II amplificando la respuesta inflamatoria.

3. La quimasa mastocitaria contribuye también a la formación de Ang-II a partir de Ang-I *in vivo* por mecanismos independientes de la ECA.

4. El bloqueo del receptor AT₁ de Ang-II puede representar el mejor tratamiento para prevenir el daño vascular inducido por la Ang-II generada endógenamente, contribuyendo a controlar el progreso de la inflamación vascular cuando exista activación tanto de las vías dependientes como independientes de ECA.

5. El EHT produce expresión de FRK en células endoteliales arteriales pero no en aquellas de origen venoso.

6. La acumulación de leucocitos mononucleares en células endoteliales arteriales inducida por EHT es dependiente de la expresión de FRK. Estos dos hallazgos indican la existencia de diferencias funcionales entre el endotelio arterial y venoso en respuesta a un mismo estímulo.

7. Tanto la expresión de FRK como la acumulación de leucocitos mononucleares en respuesta a la estimulación endotelial con EHT están mediadas por vías de señalización redox-sensibles ya que inhibidores de NFκB, ERK1/2, p38 MAPK o de la NADPH oxidasa, reducen significativamente estas respuestas.

8. El TNFα parece estar implicado en la expresión de FRK y la acumulación de leucocitos mononucleares inducida por EHT. Además, los monocitos y linfocitos circulantes de pacientes con EPOC mostraron mayor

expresión de receptor de FRK (CX₃CR1) y en un mayor porcentaje que en células de voluntarios sanos no fumadores.

9. Fármacos que antagonicen el receptor de FRK (CX₃CR1) o que neutralicen la actividad de esta quimiocina, podrían ser efectivos en la prevención del daño endotelial que se observa en patologías cardiovasculares asociadas a la EPOC.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA.

Abo A, Pick E (1991). Purification and characterization of a third cytosolic component of the superoxide-generating NADPH oxidase of macrophages. *J Biol Chem* **266**(35): 23577-23585.

Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, *et al.* (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* **109**(2): 227-233.

Agusti A (2007). Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease: what we know and what we don't know (but should). *Proc Am Thorac Soc* **4**(7): 522-525.

Agusti AG (2005). Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**(4): 367-370; discussion 371-362.

Ahn SY, Cho CH, Park KG, Lee HJ, Lee S, Park SK, *et al.* (2004). Tumor necrosis factor-alpha induces fractalkine expression preferentially in arterial endothelial cells and mithramycin A suppresses TNF-alpha-induced fractalkine expression. *Am J Pathol* **164**(5): 1663-1672.

Akasu M, Urata H, Kinoshita A, Sasaguri M, Ideishi M, Arakawa K (1998). Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro. *Hypertension* **32**(3): 514-520.

Alcazar R, Ruiz-Ortega M, Egido J (2003). [Angiotensin II : a key peptide in vascular and renal failure]. *Nefrologia* **23 Suppl 4**: 27-35.

Aldonyte R, Jansson L, Piitulainen E, Janciauskiene S (2003). Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respir Res* **4**: 11.

Alvarez A, Cerda-Nicolas M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panes J, *et al.* (2004). Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* **104**(2): 402-408.

Alvarez A, Sanz MJ (2001). Reactive oxygen species mediate angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *J Leukoc Biol* **70**(2): 199-206.

Ambrose JA, Barua RS (2004). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol* **43**(10): 1731-1737.

Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, *et al.* (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* **197**(12): 1701-1707.

Arakawa K, Ikeda M, Fukuyama J, Sakai T (1976). A pressor formation by trypsin from renin-denatured human plasma protein. *J Clin Endocrinol Metab*

42(3): 599-602.

Arakawa K, Maruta H (1980). Ability of kallikrein to generate angiotensin II-like pressor substance and a proposed 'kinin-tensin enzyme system'. *Nature* **288(5792): 705-706.**

Arakawa K, Yuki M, Ikeda M (1980). Chemical identity of tryptensin with angiotensin. *Biochem J* **187(3): 647-653.**

Ardailou R (1998). Angiotensin II-complexities beyond AT1 and AT2 receptors. *Nephrol Dial Transplant* **13(12): 2988-2990.**

Astrup P, Kjeldsen K (1979). Model studies linking carbon monoxide and/or nicotine to arteriosclerosis and cardiovascular disease. *Prev Med* **8(3): 295-302.**

Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* **52(3): 741-744.**

Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* **397(2): 342-344.**

Baraldo S, Lokar Oliani K, Turato G, Zuin R, Saetta M (2007). The Role of Lymphocytes in the Pathogenesis of Asthma and COPD. *Curr Med Chem* **14(21): 2250-2256.**

Baraldo S, Turato G, Badin C, Bazzan E, Beghe B, Zuin R, *et al.* (2004). Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax* **59(4): 308-312.**

Barnes PJ (2004). Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **50 Online Pub: OL627-637.**

Barreiro E, Schols AM, Polkey MI, Galdiz JB, Gosker HR, Swallow EB, *et al.* (2008). Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax* **63(2): 100-107.**

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, *et al.* (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385(6617): 640-644.**

BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi B, *et al.* (2007). NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **42(4): 446-459.**

Benowitz NL (1997). The role of nicotine in smoking-related cardiovascular disease. *Prev Med* **26(4): 412-417.**

Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG (2001). Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(6): H2337-2365.

Bizeto L, Mazzolini AB, Ribeiro M, Stelmach R, Cukier A, Nunes MP (2008). Interrelationship between serum and sputum inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Braz J Med Biol Res* **41**(3): 193-198.

Bjerkeli V, Damas JK, Fevang B, Holter JC, Aukrust P, Froland SS (2007). Increased expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in Wegener's granulomatosis--possible role in vascular inflammation. *Rheumatology (Oxford)* **46**(9): 1422-1427.

Bolinder G, Alfredsson L, Englund A, de Faire U (1994). Smokeless tobacco use and increased cardiovascular mortality among Swedish construction workers. *Am J Public Health* **84**(3): 399-404.

Borchers MT, Wesselkamper SC, Harris NL, Deshmukh H, Beckman E, Vitucci M, Tichelaar JW, Leikauf GD (2007) CD8+ T cells contribute to macrophage accumulation and airspace enlargement following repeated irritant exposure. *Exp Mol Pathol* **83**(3):301-10

Borland JA, Kelsall C, Yacoub MH, Chester AH (2005). Expression, localisation and function of ACE and chymase in normal and atherosclerotic human coronary arteries. *Vascul Pharmacol* **42**(3): 99-108.

Boucher R, Demassieux S, Garcia R, Gutkowska Y, Genest J (1977). [The tonin-angiotensin II system]. *Union Med Can* **106**(4): 502-507.

Brasier AR, Recinos A, 3rd, Eledrisi MS (2002). Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(8): 1257-1266.

Caligiuri G (2004). [Role of the immune response in atherosclerosis and acute coronary syndromes]. *Med Sci (Paris)* **20**(2): 175-181.

Calzada MJ, del Peso L. (2007) Hypoxia-inducible factors and cancer. *Clin Transl Oncol* **9**(5):278-89. Review

Caughey GH (2007). Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunol Rev* **217**: 141-154.

Caughey GH, Raymond WW, Wolters PJ (2000). Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochim Biophys Acta* **1480**(1-2): 245-257.

Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, *et al.* (2006). NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* **8**(5-6): 691-728.

Celi A, Lorenzet R, Furie B, Furie BC (1997). Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Semin Hematol* **34**(4): 327-335.

Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, Bysani S, Dulin NO, Liu F, *et al.* (2003). Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. *Biochem J* **373**(Pt 2): 547-558.

Charo IF, Taubman MB (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* **95**(9): 858-866.

Chatterjee PK, Brown PA, Cuzzocrea S, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, *et al.* (2001). Calpain inhibitor-1 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Kidney Int* **59**(6): 2073-2083.

Cheng Q, McKeown SJ, Santos L, Santiago FS, Khachigian LM, Morand EF, *et al.* (2010). Macrophage migration inhibitory factor increases leukocyte-endothelial interactions in human endothelial cells via promotion of expression of adhesion molecules. *J Immunol* **185**(2): 1238-1247.

Clouse WD, Yamaguchi H, Phillips MR, Hurt RD, Fitzpatrick LA, Moyer TP, *et al.* (2000). Effects of transdermal nicotine treatment on structure and function of coronary artery bypass grafts. *J Appl Physiol* **89**(3): 1213-1223.

Combadière C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, *et al.* (2003) Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* **107**(7):1009-16

Cornish KG, Joyner WL, Gilmore JP (1979). Direct evidence for the presence of a different converting enzyme in the hamster cheek pouch. *Circ Res* **44**(4): 540-544.

Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE (1989). Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *BMJ* **298**(6676): 784-788.

Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, *et al.* (1993). The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* **171**(3): 223-229.

de Boer WI, Yao H, Rahman I (2007). Future therapeutic treatment of COPD: struggle between oxidants and cytokines. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **2**(3): 205-228.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* **52**(3): 415-472.

Dell'Italia LJ, Husain A (2002). Dissecting the role of chymase in angiotensin II formation and heart and blood vessel diseases. *Curr Opin Cardiol* **17**(4): 374-379.

Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, *et al.* (2002). Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* **20**(3): 556-563.

Doggrell SA, Wanstall JC (2004). Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. *Cardiovasc Res* **61**(4): 653-662.

Donadelli R, Zanchi C, Morigi M, Buelli S, Batani C, Tomasoni S, *et al.* (2003). Protein overload induces fractalkine upregulation in proximal tubular cells through nuclear factor kappaB- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J Am Soc Nephrol* **14**(10): 2436-2446.

Doz E, Noulin N, Boichot E, Guenon I, Fick L, Le Bert M, *et al.* (2008). Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol* **180**(2): 1169-1178.

Dragomir E, Manduteanu I, Calin M, Gan AM, Stan D, Koenen RR, *et al.* (2008). High glucose conditions induce upregulation of fractalkine and monocyte chemoattractant protein-1 in human smooth muscle cells. *Thromb Haemost* **100**(6): 1155-1165.

Dvorak AM (1997). New aspects of mast cell biology. *Int Arch Allergy Immunol* **114**(1): 1-9.

Dworakowski R, Walker S, Momin A, Desai J, El-Gamel A, Wendler O, *et al.* (2008). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived superoxide and vascular endothelial dysfunction in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* **51**(14): 1349-1356.

Dzau VJ (2001). Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* **37**(4): 1047-1052.

Edirisinghe I, Yang SR, Yao H, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, *et al.* (2008). VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *FASEB J* **22**(7): 2297-2310.

Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, Rabe KF (2008). Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J* **31**(1): 204-212.

Ferrer E, Peinado VI, Díez M, Carrasco JL, Musri MM, Martínez A, Rodríguez-Roisin R, Barberà JA (2009). Effects of cigarette smoke on endothelial function of pulmonary arteries in the guinea pig. *Respir Res*. Aug 14; **10**:76.

Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG (1995). Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **152**(5 Pt 1): 1666-1672.

Foschino Barbaro MP, Carpagnano GE, Spanevello A, Cagnazzo MG, Barnes

PJ (2007). Inflammation, oxidative stress and systemic effects in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**(4): 753-763.

Franco M, Cooper RS, Bilal U, Fuster (2011) Challenges and opportunities for cardiovascular disease prevention. *Am J Med.* **124**(2):95-102.

Gaboury JP, Johnston B, Niu XF, Kubes P (1995). Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo. *J Immunol* **154**(2): 804-813.

Galli SJ, Nakae S, Tsai M (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**(2): 135-142.

Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD (2004). Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* **59**(7): 574-580.

Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, *et al.* (2000). NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. *J Leukoc Biol* **67**(4): 577-584.

Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, *et al.* (2001). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* **276**(41): 37993-38001.

Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**(1): 71-82.

Gkaliagkousi E, Ferro A. 2011Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci.*; **16**:1873-97

Glass CK, Witztum JL (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**(4): 503-516.

Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, Utzel K, Brocker EB, Rapp UR, *et al.* (2001). Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood* **97**(1): 46-55.

Gordon JR (2000). Monocyte chemoattractant peptide-1 expression during cutaneous allergic reactions in mice is mast cell dependent and largely mediates the monocyte recruitment response. *J Allergy Clin Immunol* **106**(1 Pt 1): 110-116.

Gosker HR, Langen RC, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG, Steele C, *et al.* (2009). Extrapulmonary manifestations of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**(6): 710-716.

Goto K, Fujii K, Onaka U, Abe I, Fujishima M (2000). Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents age-related endothelial dysfunction. *Hypertension* **36**(4): 581-587.

Grafe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, *et al.* (1997). Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res* **81**(5): 804-811.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* **86**(5): 494-501.

Grote K, Drexler H, Schieffer B (2004). Renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* **19**(4): 770-773.

Guimaraes S, Pinheiro H (2005). Functional evidence that in the cardiovascular system AT1 angiotensin II receptors are AT1B prejunctionally and AT1A postjunctionally. *Cardiovasc Res* **67**(2): 208-215.

Guo T, Chen WQ, Zhang C, Zhao YX, Zhang Y (2009). Chymase activity is closely related with plaque vulnerability in a hamster model of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **207**(1): 59-67.

Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG (2003). Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation* **107**(3): 416-421.

Hall JD, Kurtz SL, Rigel NW, Gunn BM, Taft-Benz S, Morrison JP, *et al.* (2009). The impact of chemokine receptor CX3CR1 deficiency during respiratory infections with *Mycobacterium tuberculosis* or *Francisella tularensis*. *Clin Exp Immunol* **156**(2): 278-284.

Hasegawa M, Sato S, Echigo T, Hamaguchi Y, Yasui M, Takehara K (2005) Up regulated expression of fractalkine/CX3CL1 and CX3CR1 in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* ;**64**(1):21-8

Haskell CA, Cleary MD, Charo IF (1999). Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation. *J Biol Chem* **274**(15): 10053-10058.

Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, *et al.* (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res* **86**(2): E36-41.

Henrion D, Kubis N, Levy BI (2001). Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension* **38**(5): 1150-1157.

Hines J, Fluharty SJ, Yee DK (2003). Structural determinants for the activation mechanism of the angiotensin II type 1 receptor differ for phosphoinositide hydrolysis and mitogen-activated protein kinase pathways. *Biochem Pharmacol* **66**(2): 251-262.

House, S. D., and Lipowsky, H. H. (1987). *Microvasc Res* **34**(3), 363-379

Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TM, Donaldson GC, Wedzicha JA (2006). Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **173**(1): 71-78.

Ihara M, Urata H, Kinoshita A, Suzumiya J, Sasaguri M, Kikuchi M, *et al.* (1999). Increased chymase-dependent angiotensin II formation in human atherosclerotic aorta. *Hypertension* **33**(6): 1399-1405.

Illumets H, Rytala P, Demedts I, Brusselle GG, Sovijarvi A, Myllarniemi M, *et al.* (2007). Matrix metalloproteinases -8, -9 and -12 in smokers and patients with stage 0 COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **2**(3): 369-379.

Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, *et al.* (1997). Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* **91**(4): 521-530.

Imaizumi T, Matsumiya T, Fujimoto K, Okamoto K, Cui X, Ohtaki U, *et al.* (2000). Interferon-gamma stimulates the expression of CX3CL1/fractalkine in cultured human endothelial cells. *Tohoku J Exp Med* **192**(2): 127-139.

Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K (2004). Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* **11**(1): 15-21.

Inoue N, Muramatsu M, Jin D, Takai S, Hayashi T, Katayama H, *et al.* (2009). Effects of chymase inhibitor on angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm development in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **204**(2): 359-364.

Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N, *et al.* (2008). Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol* **181**(6): 4208-4218.

Ito H, Takemori K, Suzuki T (2001). Role of angiotensin II type 1 receptor in the leucocytes and endothelial cells of brain microvessels in the pathogenesis of hypertensive cerebral injury. *J Hypertens* **19**(3 Pt 2): 591-597.

Izquierdo Alonso JL, Arroyo-Espliguero R (2005). [Chronic obstructive pulmonary disease and cardiovascular risk]. *Arch Bronconeumol* **41**(8): 410-412.

Jeong SH, Park JH, Kim JN, Park YH, Shin SY, Lee YH, *et al.* (2010). Up-regulation of TNF-alpha secretion by cigarette smoke is mediated by Egr-1 in HaCaT human keratinocytes. *Exp Dermatol* **19**(8): e206-212.

Jin D, Takai S, Sakaguchi M, Okamoto Y, Muramatsu M, Miyazaki M (2004). An antiarrhythmic effect of a chymase inhibitor after myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther* **309**(2): 490-497.

Jippo T, Tsujino K, Kim HM, Kim DK, Lee YM, Nawa Y, *et al.* (1997). Expression of mast-cell-specific proteases in tissues of mice studied by in situ hybridization. *Am J Pathol* **150**(4): 1373-1382.

Kaartinen M, Penttila A, Kovanen PT (1994). Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. *Circulation* **90**(4): 1669-1678.

Kalra VK, Ying Y, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD (1994). Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* **160**(1): 154-162.

Kasama T, Wakabayashi K, Sato M, Takahashi R, Isozaki T (2010) Relevance of the CX3CL1/fractalkine-CX3CR1 pathway in vasculitis and vasculopathy. *Transl Res* **155**(1): 20-26.

Kayyali US, Budhiraja R, Pennella CM, Cooray S, Lanzillo JJ, Chalkley R, *et al.* (2003). Upregulation of xanthine oxidase by tobacco smoke condensate in pulmonary endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **188**(1): 59-68.

Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ (1996). Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **153**(2): 530-534.

Kelley J, Hemontolor G, Younis W, Li C, Krishnaswamy G, Chi DS (2006). Mast cell activation by lipoproteins. *Methods Mol Biol* **315**: 341-348.

Kelley JL, Chi DS, Abou-Auda W, Smith JK, Krishnaswamy G (2000). The molecular role of mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease. *Mol Med Today* **6**(8): 304-308.

Kerfoot SM, Lord SE, Bell RB, Gill V, Robbins SM, Kubes P (2003). Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. *Eur J Immunol* **33**(3): 729-739.

Kim S, Iwao H. (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* ;**52**(1):11-34.

Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM, Husain A (1991). Multiple determinants for the high substrate specificity of an angiotensin II-forming chymase from the human heart. *J Biol Chem* **266**(29): 19192-19197.

Kitamura Y (1989). Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* **7**: 59-76.

Kojda G, Harrison D (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* **43**(3): 562-571.

Kourilsky P, Truffa-Bachi P (2001). Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol* **22**(9): 502-509.

Kovanen PT (2007). Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. *Immunol Rev* **217**: 105-122.

Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W (2006). The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol* **57**(4): 529-539.

Kubes P, Kanwar S (1994). Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol* **152**(7): 3570-3577.

Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, *et al.* (1993). Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* **92**(4): 537-548.

Lagente V, Planquois JM, Leclerc O, Schmidlin F, Bertrand CP (2008). Oxidative stress is an important component of airway inflammation in mice exposed to cigarette smoke or lipopolysaccharide. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35**(5-6): 601-605.

Laine P, Kaartinen M, Penttila A, Panula P, Paavonen T, Kovanen PT (1999). Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation* **99**(3): 361-369.

Lambeth JD (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* **4**(3): 181-189.

Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2004). Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* **109**(21 Suppl 1): II27-33.

Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, *et al.* (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* **88**(9): 888-894.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG (1997). Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* **95**(3):588-93.

Lazarus B, Messina A, Barker JE, Hurley JV, Romeo R, Morrison WA, *et al.*

(2000). The role of mast cells in ischaemia-reperfusion injury in murine skeletal muscle. *J Pathol* **191**(4): 443-448.

Le Quement C, Guenon I, Gillon JY, Valenca S, Cayron-Elizondo V, Lagente V, *et al.* (2008). The selective MMP-12 inhibitor, AS111793 reduces airway inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Br J Pharmacol* **154**(6): 1206-1215.

Lee M, Metso J, Jauhiainen M, Kovanen PT (2003). Degradation of phospholipid transfer protein (PLTP) and PLTP-generated pre-beta-high density lipoprotein by mast cell chymase impairs high affinity efflux of cholesterol from macrophage foam cells. *J Biol Chem* **278**(15): 13539-13545.

Lesauskaite V, Ivanoviene L, Valanciute A (2003). [Programmed cellular death and atherogenesis: from molecular mechanisms to clinical aspects]. *Medicina (Kaunas)* **39**(6): 529-534.

Lesnik P, Haskell CA, Charo IF (2003). Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* **111**(3): 333-340.

Ley K (1996). Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res* **32**(4): 733-742.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**(9): 678-689.

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P (1993). An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* **13**(2): 197-204.

Li JM, Shah AM (2002). Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* **277**(22): 19952-19960.

Li M, Liu K, Michalicek J, Angus JA, Hunt JE, Dell'Italia LJ, *et al.* (2004). Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *J Clin Invest* **114**(1): 112-120.

Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **105**(9): 1135-1143.

Lin CC, Lee IT, Yang YL, Lee CW, Kou YR, Yang CM (2010). Induction of COX-2/PGE(2)/IL-6 is crucial for cigarette smoke extract-induced airway inflammation: Role of TLR4-dependent NADPH oxidase activation. *Free Radic Biol Med* **48**(2): 240-254.

Lindstedt KA, Kovanen PT (2004). Mast cells in vulnerable coronary plaques:

potential mechanisms linking mast cell activation to plaque erosion and rupture. *Curr Opin Lipidol* **15**(5): 567-573.

Liu HW, Cheng B, Fu XB, Sun TZ, Li JF (2007). Characterization of AT1 and AT2 receptor expression profiles in human skin during fetal life. *J Dermatol Sci* **46**(3): 221-225.

Liu HW, Cheng B, Yu WL, Sun RX, Zeng D, Wang J, *et al.* (2006). Angiotensin II regulates phosphoinositide 3 kinase/Akt cascade via a negative crosstalk between AT1 and AT2 receptors in skin fibroblasts of human hypertrophic scars. *Life Sci* **79**(5): 475-483.

Lopez AD, Murray CC (1998). The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* **4**(11): 1241-1243.

Lucas AD, Bursill C, Guzik TJ, Sadowski J, Channon KM, Greaves DR (2003). Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation* **108**(20): 2498-2504.

Ludwig A, Weber C (2007). Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thromb Haemost* **97**(5): 694-703.

Lundquist A, Tchougounova E, Abrink M, Pejler G (2004). Cooperation between mast cell carboxypeptidase A and the chymase mouse mast cell protease 4 in the formation and degradation of angiotensin II. *J Biol Chem* **279**(31): 32339-32344.

Luscinskas FW, Lawler J (1994). Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J* **8**(12): 929-938.

Maclay JD, McAllister DA, Mills NL, Paterson FP, Ludlam CA, Drost EM, *et al.* (2009). Vascular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **180**(6): 513-520.

MacNee W (2000). Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* **117**(5 Suppl 1): 303S-317S.

Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, *et al.* (2004). The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* **24**(5): 1844-1854.

Majo J, Ghezzi H, Cosio MG (2001). Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* **17**(5): 946-953.

Manriquez J, Diaz O, Borzone G, Lisboa C (2004). [Spirometric reversibility to salbutamol in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Differential effects on FEV1 and on lung volumes]. *Rev Med Chil* **132**(7): 787-793.

Marone G, Triggiani M, Genovese A, De Paulis A (2005). Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv Immunol* **88**: 97-160.

Mateo T, Abu Nabah YN, Abu Taha M, Mata M, Cerda-Nicolas M, Proudfoot AE, *et al.* (2006). Angiotensin II-induced mononuclear leukocyte interactions with arteriolar and venular endothelium are mediated by the release of different CC chemokines. *J Immunol* **176**(9): 5577-5586.

Mateo T, Naim Abu Nabah Y, Losada M, Estelles R, Company C, Bedrina B, *et al.* (2007). A critical role for TNFalpha in the selective attachment of mononuclear leukocytes to angiotensin-II-stimulated arterioles. *Blood* **110**(6): 1895-1902.

Matsubara H. (1998) Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* ;**83**(12):1182-91. Review.

McComb JG, Ranganathan M, Liu XH, Pilewski JM, Ray P, Watkins SC, *et al.* (2008). CX3CL1 up-regulation is associated with recruitment of CX3CR1+ mononuclear phagocytes and T lymphocytes in the lungs during cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Pathol* **173**(4): 949-961.

McDonald JE, Padmanabhan N, Petrie MC, Hillier C, Connell JM, McMurray JJ (2001). Vasoconstrictor effect of the angiotensin-converting enzyme-resistant, chymase-specific substrate [Pro(11)(D)-Ala(12)] angiotensin I in human dorsal hand veins: in vivo demonstration of non-ace production of angiotensin II in humans. *Circulation* **104**(15): 1805-1808.

McEver RP (2010). Rolling back neutrophil adhesion. *Nat Immunol.* (4):282-4.

Mervaala EM, Muller DN, Park JK, Schmidt F, Lohn M, Breu V, *et al.* (1999). Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension* **33**(1 Pt 2): 389-395.

Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ (2007). Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* **217**: 304-328.

Michel O, Dentener M, Corazza F, Buurman W, Rylander R (2001). Healthy subjects express differences in clinical responses to inhaled lipopolysaccharide that are related with inflammation and with atopy. *J Allergy Clin Immunol* **107**(5): 797-804.

Miyazaki M, Takai S (2001). Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res* **24**(3): 189-193.

Mortaz E, Lazar Z, Koenderman L, Kraneveld AD, Nijkamp FP, Folkerts G (2009). Cigarette smoke attenuates the production of cytokines by human plasmacytoid dendritic cells and enhances the release of IL-8 in response to TLR-9 stimulation. *Respir Res* **10**: 47.

Mueller R, Chanez P, Campbell AM, Bousquet J, Heusser C, Bullock GR (1996). Different cytokine patterns in bronchial biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Respir Med* **90**(2): 79-85.

Nabah YN, Mateo T, Cerda-Nicolas M, Alvarez A, Martinez M, Issekutz AC, *et al.* (2005). L-NAME induces direct arteriolar leukocyte adhesion, which is mainly mediated by angiotensin-II. *Microcirculation* **12**(5): 443-453.

Nabah YN, Mateo T, Estelles R, Mata M, Zagorski J, Sarau H, *et al.* (2004). Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines. *Circulation* **110**(23): 3581-3586.

Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J (2003). Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J* **79**(930): 195-199; quiz 198-200.

Ning W, Li CJ, Kaminski N, Feghali-Bostwick CA, Alber SM, Di YP, *et al.* (2004). Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(41): 14895-14900.

Nishimura M, Umehara H, Nakayama T, Yoneda O, Hieshima K, Kakizaki M, *et al.* (2002). Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J Immunol* **168**(12): 6173-6180.

Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, *et al.* (2001). Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **56**(6): 432-437.

Nomiyama H, Imai T, Kusuda J, Miura R, Callen DF, Yoshie O (1998). Human chemokines fractalkine (SCYD1), MDC (SCYA22) and TARC (SCYA17) are clustered on chromosome 16q13. *Cytogenet Cell Genet* **81**(1): 10-11.

Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HL (1988). Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science* **242**(4883): 1298-1301.

Oksjoki R, Laine P, Helske S, Vehmaan-Kreula P, Mayranpaa MI, Gasque P, *et al.* (2007). Receptors for the anaphylatoxins C3a and C5a are expressed in human atherosclerotic coronary plaques. *Atherosclerosis* **195**(1): 90-99.

Okunishi H, Miyazaki M, Okamura T, Toda N (1987). Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem Biophys Res Commun* **149**(3): 1186-1192.

Orosz Z, Csiszar A, Labinsky N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, *et al.* (2007). Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(1): H130-139.

Osterud B, Bjorklid E (2003). Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* **83**(4): 1069-1112.

Oudijk EJ, Lammers JW, Koenderman L (2003). Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* **46**: 5s-13s.

Pallaoro M, Fejzo MS, Shayesteh L, Blount JL, Caughey GH (1999). Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3. *J Biol Chem* **274**(6): 3355-3362.

Paoletti R, Gotto AM, Jr., Hajjar DP (2004). Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation* **109**(23 Suppl 1): III20-26.

Park JW, Yoon JY, Kim YJ, Kyung SY, Lee SP, Jeong SH, *et al.*(2010) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibition attenuates cigarette smoke extract (CSE) induced-death inducing signaling complex (DISC) formation in human lung fibroblasts (MRC-5) cells. *J Toxicol Sci* **35**(1): 33-39.

Pellegrini MP, Newby DE, Maxwell S, Webb DJ (2001). Short-term effects of transdermal nicotine on acute tissue plasminogen activator release in vivo in man. *Cardiovasc Res* **52**(2): 321-327.

Penn A, Snyder C (1988). Arteriosclerotic plaque development is 'promoted' by polynuclear aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* **9**(12): 2185-2189.

Perez-Amodio S, Tra W, Rakhorst HA, Hovius SE, van Neck J. (2011) Hypoxia preconditioning of tissue engineered mucosa enhances its angiogenic capacity in vitro. *Tissue Eng Part A*

Petrescu F, Voican SC, Silosi I (2010). Tumor necrosis factor-alpha serum levels in healthy smokers and nonsmokers. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **5**: 217-222.

Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz AC, Esplugues JV, *et al.* (2000). Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation* **102**(17): 2118-2123.

Pryor WA, Stone K (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* **686**: 12-27; discussion 27-18.

Qamar W, Sultana S Polyphenols from *Juglans regia* L. (2010) (Walnut) kernel modulate cigarette smoke extract induced acute inflammation, oxidative stress and lung injury in Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*.

Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I (2008). Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid*

Redox Signal **10**(4): 799-811.

Raud J, Lindbom L, Dahlen SE, Hedqvist P (1989). Periarteriolar localization of mast cells promotes oriented interstitial migration of leukocytes in the hamster cheek pouch. *Am J Pathol* **134**(1): 161-169.

Reape TJ, Groot PH (1999). Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **147**(2): 213-225.

Reid AC, Silver RB, Levi R (2007). Renin: at the heart of the mast cell. *Immunol Rev* **217**: 123-140.

Reid AC, Silver RB, Levi R (2007). Renin: at the heart of the mast cell. *Immunol Rev* **217**: 123-140.

Reinhardt PH, Kubes P (1998). Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood* **92**(12): 4691-4699.

Reiss K, Maretzky T, Haas IG, Schulte M, Ludwig A, Frank M, *et al.* (2006). Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem* **281**(31): 21735-21744.

Richard V, Hurel-Merle S, Scalbert E, Ferry G, Lallemand F, Bessou JP, *et al.* (2001). Functional evidence for a role of vascular chymase in the production of angiotensin II in isolated human arteries. *Circulation* **104**(7): 750-752.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. (1993) *Nature*. **362**(6423):801-9. Review.

Ruberg FL, Loscalzo J (2002). Prothrombotic determinants of coronary atherothrombosis. *Vasc Med* **7**(4): 289-299.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, *et al.* (2001)a. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* **38**(6): 1382-1387.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J (2001)b. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**(3): 321-329.

Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, *et al.* (2002)a. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**(5): 602-609.

Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, *et al.* (2002)b. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**(4): L867-873.

Sallusto F, Baggiolini M. (2008) Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol.* 2008 **(9)**:949-52

Sanz MJ, Hickey MJ, Johnston B, McCafferty DM, Raharjo E, Huang PL, *et al.* (2001). Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *Br J Pharmacol* **134**(2): 305-312.

Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kalra VK (1996). Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* **270**(5 Pt 2): H1624-1633.

Shih RH, Lee IT, Hsieh HL, Kou YR, Yang CM . (2010) Cigarette smoke extract induces HO-1 expression in mouse cerebral vascular endothelial cells: involvement of c-Src/NADPH oxidase/PDGFR/JAK2/STAT3 pathway. *J Cell Physiol* **225**(3): 741-750.

Shimada K, Yazaki Y (1978). Binding sites for angiotensin II in human mononuclear leucocytes. *J Biochem* **84**(4): 1013-1015.

Sin DD, Leung R, Gan WQ, Man SP (2007). Circulating surfactant protein D as a potential lung-specific biomarker of health outcomes in COPD: a pilot study. *BMC Pulm Med* **7**: 13.

Smith CJ, Fischer TH (2001). Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* **158**(2): 257-267.

Springer TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**(2): 301-314.

Steeber DA, Venturi GM, Tedder TF (2005). A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. *Trends Immunol* **26**(1): 9-12.

Stolle K, Berges A, Lietz M, Lebrun S, Wallerath T (2010) Cigarette smoke enhances abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-treated apolipoprotein E-deficient mice. *Toxicol.lett* **199**(3):403-9

Sukkar MB, Issa R, Xie S, Oltmanns U, Newton R, Chung KF (2004). Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN-gamma and TNF-alpha and regulation by TGF-beta and corticosteroids. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**(6): L1230-1240.

Sullivan GW, Lee DD, Ross WG, DiVietro JA, Lappas CM, Lawrence MB, *et al.* (2004). Activation of A2A adenosine receptors inhibits expression of alpha 4/beta 1 integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol* **75**(1): 127-134.

Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, Yang M, Kitamoto S, Libby P, *et al.* (2007).

Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med* **13**(6): 719-724.

Sun J, Sukhova GK, Yang M, Wolters PJ, MacFarlane LA, Libby P, *et al.* (2007)a. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest* **117**(11): 3359-3368.

Sun YP, Zhu BQ, Browne AE, Sievers RE, Bekker JM, Chatterjee K, *et al.* (2001)b. Nicotine does not influence arterial lipid deposits in rabbits exposed to second-hand smoke. *Circulation* **104**(7): 810-814.

Suzuki H, Caughey GH, Gao XP, Rubinstein I (1998). Mast cell chymase-like protease(s) modulates Escherichia coli lipopolysaccharide-induced vasomotor dysfunction in skeletal muscle in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **284**(3): 1156-1164.

Takai S, Jin D, Muramatsu M, Miyazaki M (2004). Chymase as a novel target for the prevention of vascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* **25**(10): 518-522.

Takai S, Sakonjo H, Fukuda K, Jin D, Sakaguchi M, Kamoshita K, *et al.* (2003). A novel chymase inhibitor, 2-(5-formylamino-6-oxo-2-phenyl-1,6-dihydropyrimidine-1-yl)-N-[[4-dioxo-1-phenyl-7-(2-pyridyloxy)]2-heptyl]acetamide (NK3201), suppressed intimal hyperplasia after balloon injury. *J Pharmacol Exp Ther* **304**(2): 841-844.

Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, *et al.* (2002). Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax* **57**(5): 405-411.

Tom B, Garrelds IM, Scalbert E, Stegmann AP, Boomsma F, Saxena PR, *et al.* (2003). ACE-versus chymase-dependent angiotensin II generation in human coronary arteries: a matter of efficiency? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(2): 251-256.

Tonnesen MG, Klempner MS, Austen KF, Wintroub BU (1982). Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest* **69**(1): 25-30.

Trachte GJ, Lefer AM (1979). Inotropic and vasoactive effects of the naturally occurring angiotensins in isolated cat cardiac muscle and coronary arteries. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **25**(3): 419-427.

Tracy RP, Psaty BM, Macy E, Bovill EG, Cushman M, Cornell ES, *et al.* (1997). Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(10): 2167-2176.

Tsou CL, Haskell CA, Charo IF (2001). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem* **276**(48): 44622-44626.

Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, *et al.* (1999). Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* **100**(11): 1223-1229.

Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T (2004). Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(1): 34-40.

Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, *et al.* (1996). Angiotensin receptors. *J Hypertens Suppl* **14**(5): S95-103.

Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, *et al.* (1993). Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest* **91**(4): 1269-1281.

Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A (1990)a Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* **66**(4): 883-890.

Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A (1990)b. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* **265**(36): 22348-22357.

Urata H, Kinoshita A, Perez DM, Misono KS, Bumpus FM, Graham RM, *et al.* (1991). Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase. *J Biol Chem* **266**(26): 17173-17179.

Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, *et al.* (2002). Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* **166**(9): 1218-1224.

Volpe M, Savoia C, De Paolis P, Ostrowska B, Tarasi D, Rubattu S (2002). The renin-angiotensin system as a risk factor and therapeutic target for cardiovascular and renal disease. *J Am Soc Nephrol* **13** **Suppl 3**: S173-178.

von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC (1991). Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17): 7538-7542.

Wagner JG, Roth RA (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* **52**(3): 349-374.

Wang HB, Wang JT, Zhang L, Geng ZH, Xu WL, Xu T, *et al.* (2007). P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat Immunol* **8**(8): 882-892.

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, *et*

al. (1999). Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* **99**(15): 2027-2033.

Wassmann S, Nickenig G (2006). Pathophysiological regulation of the AT1-receptor and implications for vascular disease. *J Hypertens Suppl* **24**(1): S15-21.

Watanabe T, Barker TA, Berk BC (2005). Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension* **45**(2): 163-169.

Weber C, Schober A, Zerneck A (2004). Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(11): 1997-2008.

Williams CM, Galli SJ (2000). Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med* **192**(3): 455-462.

Wintroub BU, Schechter NB, Lazarus GS, Kaempfer CE, Schwartz LB (1984). Angiotensin I conversion by human and rat chymotryptic proteinases. *J Invest Dermatol* **83**(5): 336-339.

Wolf G (2002). "The road not taken": role of angiotensin II type 2 receptor in pathophysiology. *Nephrol Dial Transplant* **17**(2): 195-198.

Wolters PJ, Laig-Webster M, Caughey GH (2000). Dipeptidyl peptidase I cleaves matrix-associated proteins and is expressed mainly by mast cells in normal dog airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**(2): 183-190.

Wong BW, Wong D, McManus BM (2002). Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol* **11**(6): 332-338.

Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP (1996). Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med* **184**(1): 81-92.

Yoneda O, Imai T, Goda S, Inoue H, Yamauchi A, Okazaki T, et al. (2000). Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol* **164**(8): 4055-4062.

