



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS

PROFESOR PATROCINANTE:
DR. CARLOS D. FIGUEROA V.
INSTITUTO DE HISTOLOGIA Y PATOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA

**BRADICININA Y LIS-Des-[Arg⁹]-BRADICININA INDUCEN LA EXPRESION DE
MOLECULAS DE ADHESION CELULAR ICAM-1 Y ELAM-1 EN CELULAS
ENDOTELIALES HUMANAS EN CULTIVO**

Tesis de grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
**grado de Licenciado en Ciencias
Biológicas**

MARCELO NICOLAS AGUILAR CARTES

VALDIVIA – CHILE

2007

A mi hijo Matías

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mi profesor patrocinante, Dr. Carlos Figueroa Valverde, quien con su constante apoyo, conocimientos y confianza me ayudo y guió en la realización de esta tesis. Agradezco también a Pamela, quien tuvo la paciencia y la disposición de guiarme en el laboratorio.

También agradecer a los Drs. Miguel Concha y Alejandra Vidal, además de todos mis compañeros de laboratorio y al personal del Instituto de Histología y Patología.

Finalmente quiero darle las gracias a mis Padres y a mi polola Claudia por haberme apoyado constantemente.

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1030258

INDICE DE CONTENIDOS

		Página
	INDICE	I
	INDICE DE FIGURAS	IV
1.	RESUMEN	1
	SUMMARY	3
2.	INTRODUCCION	4
2.1	Sistema Calicreína-Cinina	4
2.2	Receptores de Cininas	5
2.3	Receptores de cininas en células endoteliales y su rol en inflamación	6
2.4	Moléculas de adhesión celular	7
2.4.1	Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)	7
2.4.2	Selectina E o molécula de adhesión del endotelio al leucocito-1 (ELAM-1)	8
2.5	Objetivos	9
3.	MATERIALES Y METODOS	13
3.1	Cultivo de células endoteliales humanas EA.hy926	13
3.1.2	Efecto de la concentración de agonistas B ₁ y B ₂ sobre la expresión de ICAM-1	14
3.1.3	Efecto de la concentración de agonistas B ₁ y B ₂ y del tiempo de estimulación sobre la expresión de ELAM-1	15

3.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunotinción de electrotransferidos	15
3.2.1	Separación de proteínas por (SDS-PAGE)	15
3.2.2	Preparación de geles de poliacrilamida al 10%	16
3.2.3	Preparación de geles de poliacrilamida al 6%	16
3.2.4	Electrotransferencia de proteínas a membranas de Inmobilon P	16
3.2.5	Inmunorevelado de electrotransferidos	17
3.3	Inmunocitoquímica	18
3.4	Análisis de imagen y gráficos	19
4.	RESULTADOS	20
4.1	Expresión de receptores B ₁ y B ₂ de cininas en células endoteliales EA.hy926	20
4.2	La expresión de ICAM-1 depende de la concentración de LDBK y BK	22
4.3	La expresión de ELAM-1 depende de la concentración y del tiempo de estimulación con LDBK y BK	24
4.4	Evaluación de la expresión de ICAM-1 y ELAM-1 mediante inmunocitoquímica	28
4.4.1	ICAM-1	28
4.4.2	ELAM-1	30

5.	DISCUSION	32
5.1	Expresión de receptores B ₁ y B ₂ de cininas en células endoteliales EA.hy926	32
5.2	Las cininas BK y LDBK inducen la expresión de ICAM-1	33
5.3	Inmunolocalización de ICAM-1	34
5.4	BK y LDBK inducen la expresión de ELAM-1	35
5.5	Inmunolocalización de ELAM-1	36
6.	BIBLIOGRAFIA	38

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Secuencia de acontecimientos leucocitarios en la inflamación.	10
Figura 2: Estructura de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)	11
Figura 3: Estructura de la molécula de adhesión del endotelio al leucocito-1 (ELAM-1)	12
Figura 4: Inmunolocalización de receptores B ₁ y B ₂ de cininas en células endoteliales EA.hy926 en cultivo.	21
Figura 5: Expresión de ICAM-1 en células endoteliales en cultivo EA.hy926, estimuladas con dosis variables de TNF α , BK y LDBK.	23
Figura 6: Expresión de ELAM-1 en células endoteliales EA.hy926, estimuladas con dosis variables de TNF α , BK y LDBK.	25
Figura 7: Cinética de expresión de ELAM-1 en células endoteliales EA.hy926, estimuladas con TNF α y BK por periodos variables de tiempo.	27
Figura 8: Inmunolocalización de ICAM-1.	29
Figura 9: Inmunolocalización de ELAM-1.	31

1. RESUMEN

En los procesos inflamatorios las moléculas de adhesión celular, ICAM-1 y ELAM-1 cumplen un rol fundamental en el rodamiento, adhesión y transmigración del leucocito al endotelio activado por mediadores inflamatorios como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{IFN}\gamma$, entre muchos otros. Las cininas son péptidos biológicamente activos con una alta actividad pro-inflamatoria y por lo tanto podrían regular la expresión de estas moléculas en el endotelio.

Para determinar el efecto de las cininas sobre la expresión de ICAM-1 y ELAM-1, se estimularon cultivos confluentes de células endoteliales EA.hy926 con agonistas del receptor B_2 (bradicinina, BK) y B_1 (Lis-des-[Arg⁹]-bradicinina, LDBK). BK produjo un aumento en la expresión de ICAM-1, dependiente de la concentración del péptido, siendo máxima con BK 100 nM. El agonista B_1 también provocó un aumento de ICAM-1, pero la respuesta fue diferente ya que el máximo de expresión se produjo al estimular las células con LDBK 1 nM disminuyendo cuando se usó LDBK 100 nM. Por su parte, el incremento en la expresión de ELAM-1 fue proporcional al aumento de concentración de BK o LDBK, alcanzándose el máximo a una concentración 100 nM de cada péptido. ELAM-1 presentó una expresión máxima entre las 3 y 6 h post-estimulación con BK, manteniéndose al menos por 24 h. ICAM-1 y ELAM-1 presentaron una distribución variable en la célula, inmunolocalizándose tanto en la membrana celular como en el citoplasma. Nuestros resultados demuestran que las cininas, vía receptores B_1 y B_2 , regulan la expresión de moléculas adhesión celular ICAM-1 y

ELAM-1 en células endoteliales en cultivo un hecho que puede tener importantes implicancias para el desarrollo de una inflamación aguda.

SUMMARY

During inflammation, the cellular adhesion molecules, ICAM-1 and ELAM-1 execute a fundamental role in the rolling, adhesion and transmigration of leukocytes through the endothelium activated by inflammatory mediators like TNF α , IL-1 β and IFN γ . Kinins are biologically active peptides with a high pro-inflammatory activity that as such could regulate the expression of these molecules by the endothelium.

In order to determine the effect of kinins on the expression of ICAM-1 and ELAM-1, confluent cultures of endothelial cells EA.hy926 were stimulated with specific agonist of the B₂ (bradykinin, BK) or B₁ (Lys-des-[Arg⁹]-bradykinin) receptors. BK produced an increase in the expression of ICAM-1 that was dependent on the peptide concentration, being maximal at 100 nM. The B₁ agonist also produced an increase of ICAM-1, but the response was different since the maximal expression took place when stimulation was performed with 1 nM LDBK. The increase in ELAM-1 expression was proportional to the concentration of BK or LDBK used. The maximal response was reached at a 100 nM of each peptide. ELAM-1 presented a maximal expression between 3 and 6 h post-stimulation with BK, staying at high levels of expression for 24 h. ICAM-1 and ELAM-1 presented a variable distribution in the cell, immunolocalizing both on the cell membrane and in the cytoplasm. Ours results demonstrate that kinins, by activating B₁ or B₂ receptors, regulate the expression of the cellular adhesion molecules ICAM-1 and ELAM-1 in endothelial cells kept in culture.

2. INTRODUCCION

2.1 Sistema Calicreína-Cinina

Las calicreínas son un grupo de serinas proteasas que se encuentran en células específicas y fluidos biológicos. Estas enzimas se dividen en dos grandes grupos: tisulares y plasmática. Las calicreínas tisulares forman una familia de 15 proteínas entre las cuales se encuentran la calicreína verdadera (hk1) y el antígeno prostático específico (PSA o hk3). La calicreína plasmática participa en el ensamble de los distintos componentes que inician la coagulación y en especial durante la fase de activación por contacto a superficies cargadas negativamente. La principal acción de las calicreínas plasmática y tisular hk1 es liberar péptidos vasoactivos conocidos como cininas, que participan en una serie de procesos biológicos tales como relajación del músculo liso vascular (hipotensión), incremento de la permeabilidad vascular, contracción de la musculatura lisa del árbol broncopulmonar y dolor. Esta familia de péptidos comprende la liberación de bradicinina, por acción de calicreína plasmática sobre el cininógeno de alto peso molecular y además la liberación de Lis-Bradicinina, por acción de calicreína tisular hk1 sobre cininógeno de bajo peso molecular (Bhoola y col. 1992; Blais y col. 2000; Leeb-Lundberg y col. 2005). Una vez producidas, las cininas son inactivadas rápidamente por carboxi- y endo-peptidasas denominadas cininasas presentes en la sangre y tejidos. Las cininasas más importantes son la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y endopeptidasa neutra (NEP o encefalinasa). Las carboxipeptidasas remueven la Arg⁹ de la molécula de cinina,

mientras que ECA y NEP liberan el dipéptido Phe⁸-Arg⁹. La ECA puede hidrolizar adicionalmente el enlace Phe⁵-Ser⁶ (Erdos, 1979; Gafford y col. 1983).

2.2 Receptores de Cininas

Los efectos biológicos producidos por las cininas implican la activación de receptores específicos localizados en la superficie de cada célula blanco. Los receptores de cininas han sido denominados B₁ y B₂ de acuerdo a la potencia relativa de los distintos agonistas (Regoli y Barabé, 1980; Burch y Kyle, 1992; Hall, 1992; Wohlfart y col. 1997; Figueroa y col. 2001). Ambos receptores de cininas pertenecen a la superfamilia de receptores que poseen 7 dominios transmembrana y están acoplados a proteína G. Estos difieren en su estructura primaria, regulación de su expresión y distribución en los tejidos (McEachern y col. 1991; Menke y col. 1994). Estudios farmacológicos y métodos de clonamiento han permitido establecer y reconocer que el receptor B₂ es de tipo constitutivo y activado por bradicinina (BK) y Lis-bradicinina (LBK), mientras que el receptor B₁ es generalmente sobre-expresado en diferentes tipos celulares por lipopolisacáridos o citoquinas como interleuquina-1 beta (IL-1β) y es activado por des-[Arg⁹]-bradicinina (DBK) y des-[Arg⁹]-Lis-bradicinina (LDBK), originados por la acción de carboxipeptidasas sobre bradicinina y Lis-bradicinina, respectivamente (Bhoola y col. 1992). Se han desarrollado antagonistas para ambos tipos de receptores como des-[Arg⁹]-Leu⁸-bradicinina para el receptor B₁ y HOE140 para el receptor B₂ (Wirth y col. 1991). Se ha consensuado que la mayor parte de los efectos biológicos producidos por las cininas son mediados por el receptor B₂ y que

bajo condiciones de inflamación o daño tisular hay inducción del receptor B₁ (Marceau y col. 1998).

2.3 Receptores de cininas en células endoteliales y su rol en inflamación

Ambos receptores de cininas han sido demostrados en células endoteliales; la activación del receptor B₂ conduce a un incremento del Ca²⁺ intracelular, producción de óxido nítrico y prostaciclina (Schini y col. 1990). En la línea celular CPAE, se demostró la presencia de receptores midiendo los niveles de Ca²⁺ intracelular y la liberación de óxido nítrico (Smith y col. 1995). Wohlfart y col. (1997) demostraron que ambos receptores de cininas, B₁ y B₂ median el incremento del cGMP intracelular en cultivos primarios de células endoteliales de bovino. También existe evidencia de receptores de cininas en el sistema cardiovascular, así como, en células endoteliales de aorta (Colden-Stanfield y col. 1987; Mendelowitz y col. 1992).

Las cininas participan en etapas específicas de la inflamación (Bhoola y col. 1992; Bockmann y Paegelow, 2000; Couture y col. 2001). Todos los signos cardinales y síntomas de la inflamación son observados cuando las cininas son inyectadas en la piel. Primero, hay dolor debido a la estimulación de terminales sensoriales de las fibras-C, seguido por la liberación de la sustancia P, la cual se suma a la inflamación neurogénica. Luego, hay un axón que media el reflejo inflamatorio causado por una vasodilatación local y un incremento de la permeabilidad vascular, además de una extravasación de proteínas y fluidos, que resulta en la formación de un edema local. Posteriormente, la estimulación de cininas libera citoquinas desde monocitos, atrayendo leucocitos al sitio de inyección (Bhoola y col. 1992). Una particularidad importante de las

cininas es liberar citoquinas como IL-1 β y TNF α (Tiffany y Burch, 1989) y la generación de algunos segundos mensajeros como prostaglandina y leucotrienos, formados por la activación de fosfolipasa A₂. El receptor B₂ está ligado a los signos cardinales de la inflamación que incluyen aumento de la permeabilidad vascular, vasoconstricción, dilatación arteriolar y dolor con una participación limitada en relación con el reclutamiento celular en el sitio inflamado. El receptor B₁ promueve el tráfico de leucocitos sanguíneos, edema y dolor durante la inflamación (Couture y col. 2001).

En los procesos inflamatorios la adhesión y transmigración de leucocitos están determinadas por la fijación de moléculas complementarias de adhesión a la superficie de los leucocitos y células endoteliales (como una llave y una cerradura), y tanto mediadores químicos, factores quimiotácticos como ciertas citoquinas influyen en estos procesos, modulando la expresión de las moléculas de adhesión en la superficie celular (Robbins, 1994) (**Fig. 1**).

2.4 Moléculas de adhesión celular

2.4.1 Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)

La molécula de adhesión ICAM-1 es una glicoproteína de transmembrana, que se expresa en leucocitos, endotelio y epitelios (Stanley y col. 2000). Está compuesta de cinco dominios semejante a las inmunoglobulinas, posee una sola región de transmembrana y un corto dominio citoplasmático (Wertheimer y col. 1992) (**Fig. 2**); está constitutivamente presente en bajos niveles en la superficie de la célula endotelial, sin embargo, ciertos mediadores inflamatorios como IL-1 β , TNF α , IFN γ y LPS, además del neuropéptido sustancia P pueden estimular la expresión de esta molécula (Quinlan y

col. 1998; Wertheimer y col. 1992). Estudios previos indican que péptidos vasoactivos como angiotensina II también pueden regular la expresión de ICAM-1 en células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana (HUVECS) (Pastore y col. 1999). ICAM-1 presenta una cinética de expresión máxima entre las 24 y 48 h, y un mínimo de expresión entre las 4 y 6 h post-estimulación con TNF α o LPS (Silverman y col. 2001). ICAM-1 promueve la firme adhesión del leucocito al endotelio y su migración transendotelial durante la inflamación. La ruta de migración del leucocito puede ser transcelular y paracelular (Stanley y col. 2000; Yang y col. 2005). ICAM-1 interacciona con las integrinas de los leucocitos, principalmente las integrinas β_2 LFA-1 y Mac-1 (CD11a/CD18 y CD11b/CD18) (Blease y col. 1999). LFA-1 se une a los dominios 1 y 2 de ICAM-1, mientras que el ligando Mac-1 se une al dominio 3. Stanley y col. (2000), demostraron que el dominio 2 de ICAM-1 no une directamente al ligando LFA-1, pero contribuye a mantener la unión entre el dominio 1 de ICAM-1 y el ligando LFA-1.

2.4.2 Selectina E o molécula de adhesión del endotelio al leucocito-1 (ELAM-1)

La molécula de adhesión ELAM-1 es una glicoproteína de transmembrana que se expresa sólo en el endotelio (Bevilacqua y Nelson, 1993). Está compuesta por un extremo amino-terminal que reconoce carbohidratos, dominio característico de las lectinas dependientes de Ca²⁺ (tipo-C), un dominio relacionado con el factor de crecimiento epidérmico, secuencias cortas repetidas, un dominio de transmembrana y una cola citoplasmática (McEver y col. 1996) (**Fig. 3**). ELAM-1 media el rodamiento y la adhesión de leucocitos al endotelio activado por citoquinas (Bochner y col. 1991; Abbassi y col. 1993; Ulfman y col. 1999; Forlow y Ley, 2001). *In vitro*, el cultivo

endotelial expresa ELAM-1, después de haber sido estimulado con citoquinas como IL-1 β , TNF α o endotoxinas bacterianas (Bevilacqua y col. 1987). ELAM-1 presenta una cinética de expresión máxima entre las 4 y 6 h post-estimulación con citoquinas o LPS, declinando rápidamente a niveles basales donde el mínimo de expresión es detectado a las 24 h (Amberger y col. 1997). Estudios previos indican que péptidos vasoactivos como endotelina-1 también regulan la expresión de ELAM-1 en células endoteliales de arteria coronaria humana (Fernandez-Patrón y col. 2001). ELAM-1 se asocia con oligosacáridos, estructura dimérica Lewis X sialilada y lactosamina fucosilada, las cuales son expresadas en monocitos y neutrófilos circulantes, además de un pequeño porcentaje de linfocitos sanguíneos. Otro ligando de E-selectina es la proteína Lewis A sialilada, que se ha detectado en células cancerosas, sugiriendo un posible rol de ELAM-1 en la metástasis (Bevilacqua y Nelson, 1993).

Por lo tanto, el objetivo general de esta tesis es investigar si las cininas inducen o no la expresión de moléculas de adhesión celular ICAM-1 y ELAM-1 en células endoteliales en cultivo.

2.5 Objetivos

Los objetivos del presente Trabajo de Tesis son utilizar células endoteliales humanas en cultivo de la línea EA.hy926 para determinar: a) el efecto de agonistas de receptores B₁ y B₂ sobre la expresión de ICAM-1; b) el efecto de los mismos agonistas sobre la expresión de ELAM-1.

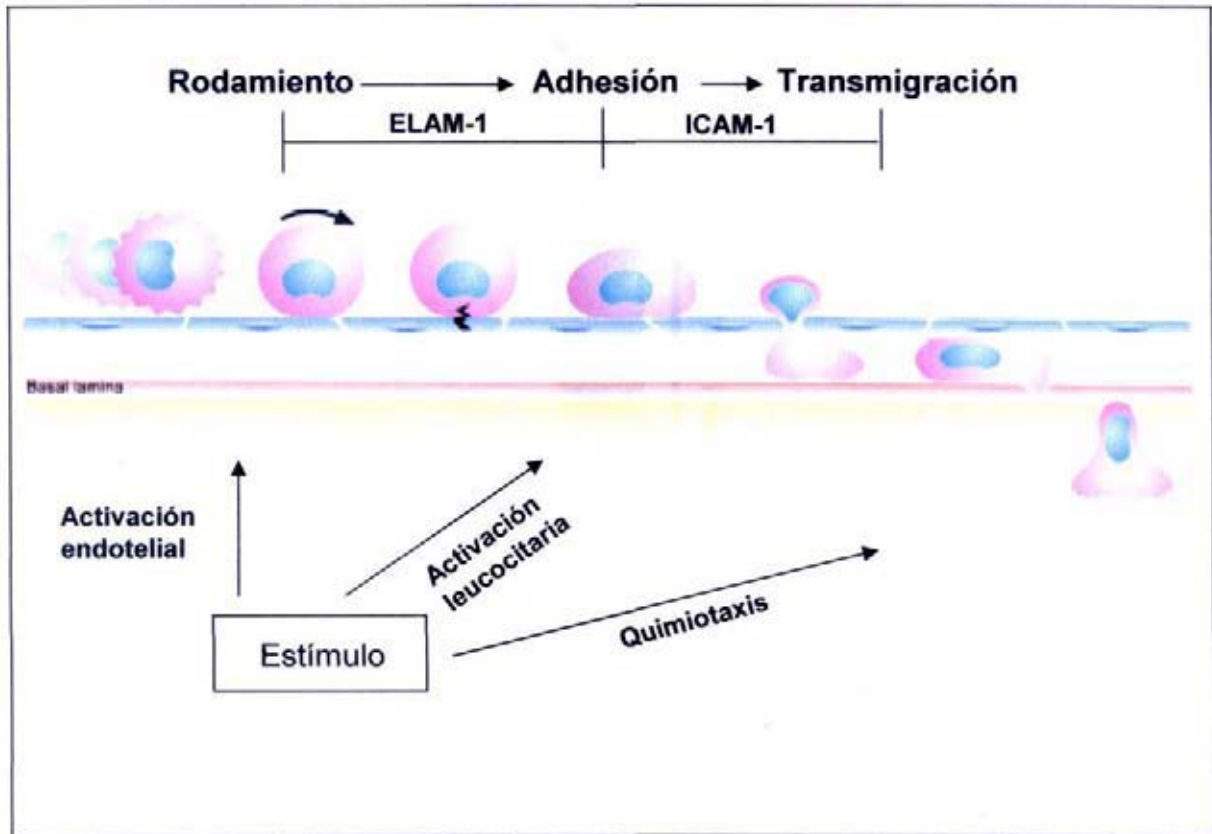


Fig 1. Secuencia de acontecimientos leucocitarios en la inflamación. En primer lugar, los leucocitos ruedan y más tarde se detienen y se adhieren al endotelio, para después efectuar la transmigración a través de la unión intercelular, atravesar la membrana basal y migrar hacia los factores quimiotácticos localizados en la zona de lesión. Se hace también una indicación de los papeles que desempeñan ICAM-1 y ELAM-1, además de los agentes activadores. Modificado de Miller, (2002)

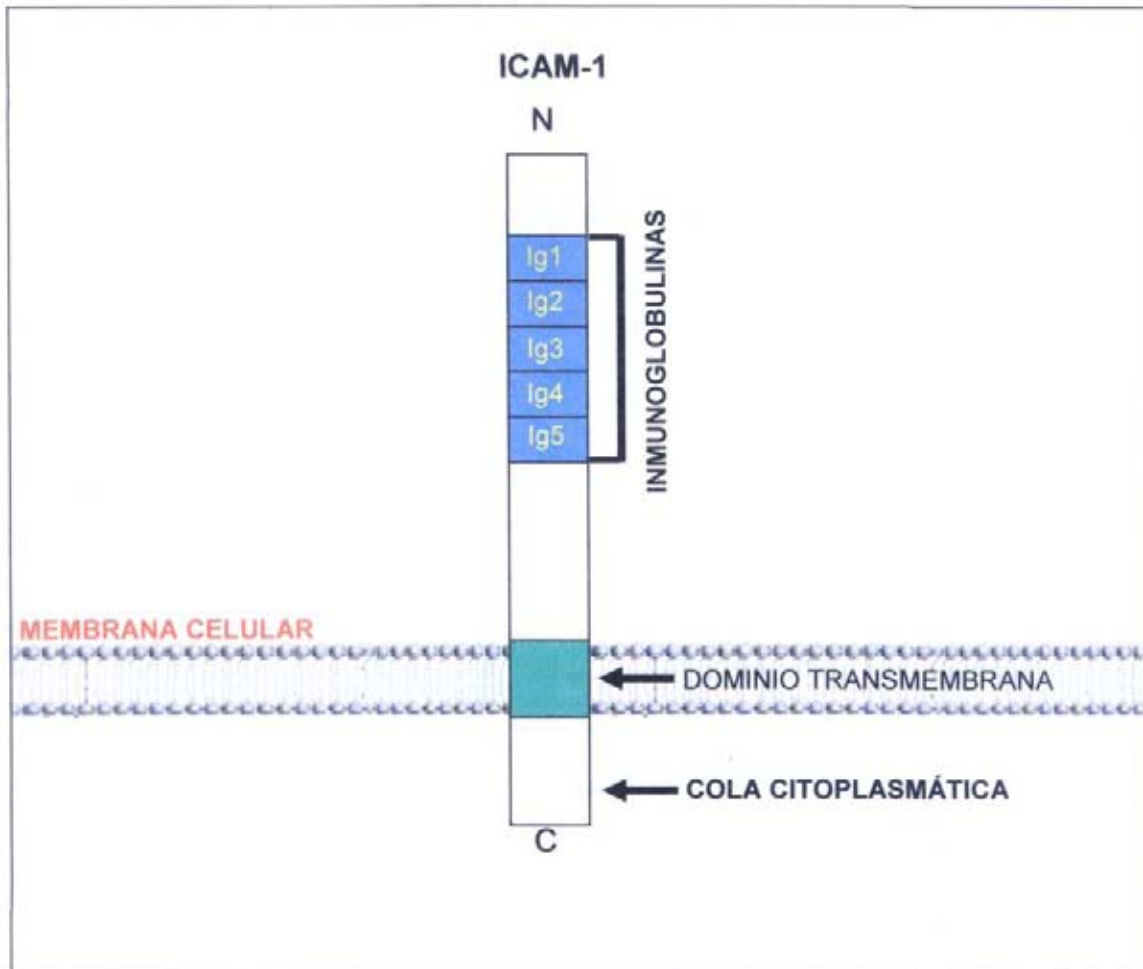


Fig. 2. Estructura de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1). Cinco dominios semejantes a inmunoglobulinas, un dominio de transmembrana y una cola citoplasmática. Modificado de Bevilacqua y Nelson, (1993).

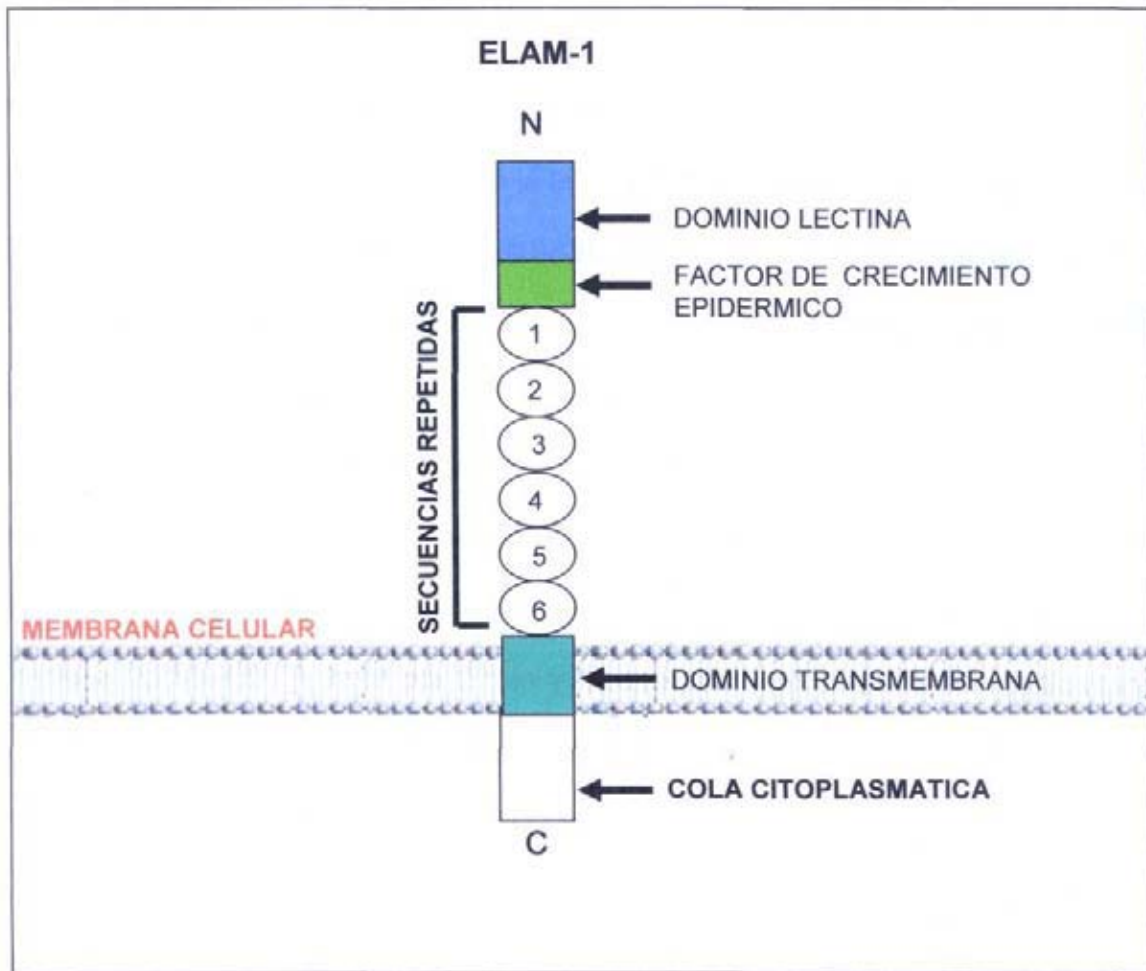


Fig. 3. Estructura de la molécula de adhesión del endotelio al leucocito (ELAM-1). Un dominio lectina, un dominio relacionado con el factor de crecimiento epidérmico, seis secuencias cortas repetidas, un dominio de transmembrana y una cola citoplasmática. Modificado de Bevilacqua y Nelson, (1993).

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Cultivo de células endoteliales humanas EA.hy926

Células endoteliales humanas de la línea EA.hy926 (1×10^6), gentilmente donadas por la Dra. C.J.S. Edgell (Edgell y col. 1983), fueron cultivadas en botellas de 25 cm² con medio Eagle Dulbecco modificado 1,8 mM Ca²⁺ (DMEM, Gibco) suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) (Gibco), 10% suero fetal de bovino (SFB; Gibco), 1% penicilina G-estreptomicina (Gibco), 1% Fungizona y glutamina 200 mM (Sigma) a 37°C en atmósfera húmeda y 5% CO₂. Este medio de cultivo fue denominado DMEM-HAT. Las células confluentes (aproximadamente a los 3 días) fueron tratadas con tripsina 0,25%-EDTA 1mM por 3 min y recuperadas con lavados en medio Hanks-10% SFB. Las células fueron contadas y la viabilidad determinada por exclusión de azul de tripano. Posteriormente fueron sembradas en placas de 30 mm en una proporción de 3×10^5 células por placa y en portaobjetos de cultivo (Lab-Tek® Chamber Slide™ System) en una proporción de 3×10^4 células por pocillo, y se dejaron en el mismo medio de cultivo DMEM-HAT por 3 días.

3.1.2 Efecto de la concentración de agonistas B₁ y B₂ sobre la expresión de ICAM-1

Cuando las células alcanzaron la confluencia se les removió el medio DMEM-HAT-10% SFB y se mantuvieron 12 h en medio DMEM-HAT sin SFB. Posteriormente, el medio fue retirado y las células fueron estimuladas por 6 h con diferentes concentraciones de BK (Bachem) y LDBK (Sigma), diluidas en medio base sin SFB. Además se utilizó TNF α (10 ng/ml) (Roche) como estímulo conocido (control positivo). Finalizada la estimulación se retiró el medio y la reacción se detuvo a 4°C y agregando 100 μ l de tampón modificado de radioinmunoprecipitación (RIPA) [Tris-HCl 50 mM, pH 7.4; NaCl 150 mM; Nonidet P-40 1%; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM], suplementado con una mezcla de inhibidores p-nitrofenilfosfato 250 μ g/ml; PMSF 200 mM; aprotinina 5 mg/ml, leupeptina 5mg/ml y pepstatina 1 mg/ml; NaF 200 mM; Na₃VO₄ 200 mM. Las células fueron luego raspadas con una espátula de teflón *policeman* de 15 cm (Chemeware®, USA) y transferidas a tubos de poliestireno de 1,5 ml (Axygen®, USA). Una vez en los tubos, las células fueron sonicadas durante 5-10 seg en hielo y se midió la concentración de proteínas totales en 10 μ l de cada extracto, según el método de Bradford (1976), a una longitud de onda de 595 nm. Como blanco se utilizó 10 μ l de tampón RIPA más 1 ml del reactivo de Bradford. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio y β -mercaptoetanol (SDS-PAGE), el cual será descrito posteriormente.

3.1.3 Efecto de la concentración de agonistas B₁ y B₂ y del tiempo de estimulación sobre la expresión de ELAM-1

Las células endoteliales crecidas bajo idénticas condiciones fueron estimuladas con diferentes concentraciones de ambos péptidos por 6 h, de acuerdo con los protocolos ya descritos. Cuando se analizó el efecto de la concentración, se estimuló las células durante 3, 6, 12 y 24 h a una concentración de 100 nM del péptido correspondiente. También se utilizó TNF α como control positivo. Posteriormente las células fueron homogenizadas con tampón RIPA como se describió anteriormente en el punto 3.1.2 y las proteínas fueron fraccionadas por SDS-PAGE al 6%.

3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunotinción de electrotransferidos

3.2.1 Separación de proteínas por SDS-PAGE

Todas las electroforesis se realizaron según el método de Laemli (1970) con algunas modificaciones. Cada una de las muestras se mantuvo a -20°C en igual volumen de tampón de muestra 2x [Tris 0,06 M; glicerol 10% p/v; 2-mercaptoetanol 0,5 % v/v y SDS 4.6 % p/v] utilizándose en cada caso, un volumen de muestra correspondiente a la cantidad de proteínas necesaria para cada ensayo. Las muestras y el estándar preteñido de proteínas de masa molecular: 118, 84, 47, 33, 26 y 18 kDa fueron hervidas por 3 min, enfriadas y colocadas en los respectivos surcos del gel. Los minigeles (ancho 100 mm, alto 65 mm y espesor 1,5 mm) fueron preparados y montados en placas de vidrio con espaciadores de teflón. La corrida electroforética se realizó en tampón Tris 0,02 M, glicina 0,05 M y SDS 0,1%. Una vez cargadas las

muestras, las proteínas fueron separadas a un voltaje constante de 100 V por aproximadamente 2 h y 30 min.

3.2.2 Preparación de geles de poliacrilamida al 10%

Gel separador (10%): Tampón inferior (Tris-HCl 1,5 M pH 8,3; SDS 0,4%) 1,8 ml; solución de acrilamida al 30% (acrilamida 29,2% y bisacrilamida 0,8%) 2,4 ml; agua destilada, 3,0 ml; persulfato de amonio al 10% 19 μ l y Temed 15 μ l.

Gel espaciador: Tampón superior (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4%) 0,94 ml; solución de acrilamida al 30%, 0,6 ml; agua destilada, 2,2 ml; persulfato de amonio al 10%, 20 μ l y Temed 10 μ l.

3.2.3 Preparación de geles de poliacrilamida al 6%

Gel separador (6%): Tampón inferior (Tris-HCl 1,5 M pH 8,3; SDS 0,4%) 1,8 ml; solución de acrilamida al 30% (acrilamida 29,2% y bisacrilamida 0,8%) 1,5 ml; agua destilada, 3,9 ml; persulfato de amonio al 10% 18,8 μ l y Temed 15 μ l.

Gel espaciador: Tampón superior (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4 %) 0,94 ml; solución de acrilamida al 30%, 0,6 ml; agua destilada, 2,2 ml; persulfato de amonio al 10%, 20 μ l y Temed 10 μ l.

3.2.4 Electrotransferencia de proteínas a membranas de Inmobilon P

La transferencia se llevó a cabo utilizando el método de Towbin y col. (1979) con algunas modificaciones. Una vez hecha la electroforesis se colocó sobre el gel una membrana de Inmobilon P® que fue previamente sumergida en metanol absoluto por

15 seg y luego equilibrada en tampón de transferencia [Tris 0,02 M, glicina 0,15 M, y metanol al 20%] por al menos 5 min. Estando la membrana sobre el gel, se cubrieron con papel filtro y esponja por ambos lados, los que habían sido previamente humedecidos en tampón de transferencia. Luego se colocaron en una cámara de electrotransferencia, orientando la membrana hacia el polo positivo del circuito. La transferencia se realizó a 50 mA por 15 h usando el tampón antes mencionado. Una vez terminado este proceso, la membrana fue separada del gel y secada durante 30 min para su posterior incubación con los anticuerpos respectivos. Cada gel fue lavado con agua destilada para luego teñir las proteínas con azul de *coomasie* por 20 min. El colorante no unido a las proteínas se eliminó lavando el gel con agua destilada. Este procedimiento tuvo por objeto verificar una migración homogénea de las proteínas y la eficiencia de su transferencia a la membrana de Inmobilon P.

3.2.5 Inmunorevelado de electrotransferidos

Cada membrana de Inmobilon P se dejó secar por 30 min a 37°C, para luego incubarla con los respectivos anticuerpos en PBS 1x conteniendo Tween-20 al 0,05% y BSA 1%. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1 humana (R&D Systems) a una dilución de 0,5 µg/ml y anti-ELAM-1 humana (R&D Systems) a una dilución de 1 µg/ml. La incubación con cada anticuerpo fue por un tiempo aproximado de 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Luego las membranas fueron lavadas con PBS 1x durante 20 min con cambios cada 5 min. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa a una dilución de 1:50.000 por 30 min a

temperatura ambiente en agitación constante. Posteriormente las membranas fueron lavadas con PBS 1x durante 20 min con cambios cada 5 min. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el método de quimioluminiscencia Super Signal West Pico (Pierce) y película Kodak BioMax ML.

3.3 Inmunocitoquímica

Las células endoteliales mantenidas en portas de cultivo (Lab-Tek[®] Chamber Slide[™] System) fueron tratadas y estimuladas con LDBK, BK y TNF α como control positivo de la reacción. Posterior a la estimulación, las células fueron lavadas con PBS 1X pH 7,4 (3 x 5 min). Para la inmunodetección de ELAM-1 las células endoteliales fueron fijadas con *p*-formaldehído al 4% (Fluka A.G), no así las células que se utilizaron para la inmunolocalización de ICAM-1. Antes de la incubación con cada anticuerpo, las células fueron permeabilizadas con una mezcla de metanol absoluto (Merck) y peróxido de hidrógeno 0,3% por 10 min a temperatura ambiente, la cual además tenía como objetivo eliminar la peroxidasa endógena de la célula. Alternativamente se permeabilizó las células agregando saponina 0,3% al buffer de dilución del anticuerpo. Para bloquear los receptores Fc de la superficie celular, se utilizó suero bovino fetal al 10%, diluido en PBS 1X y 0,5 % albúmina suero bovino (Winckler). Posteriormente, se incubó toda la noche con los anticuerpos descritos anteriormente en el punto 3.2.5 en un baño termostático a una temperatura de 22°C, anti-ICAM-1 se utilizó a una dilución de 1:1.600, mientras que anti-ELAM-1 se utilizó a una dilución de 2 μ g/ml. Una vez incubado con los anticuerpos, se lavó con PBS 1X (5 X 5 min). Las inmunoglobulinas unidas a las células fueron detectadas usando el Kit LSAB+ streptavidina-biotina (Dako)

y la peroxidasa fue revelada utilizando dos sustratos diferentes, para ICAM-1 se usó el kit 3-amino-9-ethylcarbazol (Dako) (rojo), mientras que para ELAM-1 se utilizó el kit 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (café). Los núcleos fueron teñidos con hematoxilina por 30 seg y los portaobjetos fueron cubiertos con cubreobjetos y Mowiol (Polysciences). Adicionalmente se realizó inmunocitoquímica para ambos receptores de cininas B₁ y B₂, utilizando anticuerpos específicos anti-RB₁ (Hess y col. 1996) y anti-RB₂ (Figuroa y col. 1995) a una dilución de 1:400 y 1:10.000, respectivamente. Para la inmunodetección de los receptores se utilizó el método streptavidina-biotina y la peroxidasa fue revelada utilizando el sustrato aminoethylcarbazol.

3.4 Análisis de imagen y gráficos

Con el objetivo de cuantificar la inmunoreactividad de las bandas más representativas y de las cuales nos interesaba conocer su variación se utilizaron los programas que a continuación se mencionan. Se utilizó un experimento representativo para la aplicación de estos programas.

Para el análisis densitométrico de las bandas reveladas mediante quimioluminiscencia se utilizó el programa UN-SCAN-IT gel Automated Digitizing System Versión 4.1 para Windows. Para construir los diferentes gráficos se utilizaron los datos obtenidos del análisis de imagen y se llevaron al programa SIGMAPLOT 2000. De esta manera se graficaron las intensidades en pixeles versus la condición experimental correspondiente.

4. RESULTADOS

4.1 Expresión de receptores B₁ y B₂ de cininas en células endoteliales EA.hy926

Utilizando inmunocitoquímica y anticuerpos específicos para ambos receptores de cininas, se logró demostrar su expresión en células endoteliales de la línea EA.hy926. Los receptores de cininas presentan una distribución similar en la célula, inmunolocalizándose tanto en el citoplasma como en la membrana celular. La reacción observada en el citoplasma era de aspecto granular con una distribución predominantemente en la región perinuclear (**Fig. 4**).

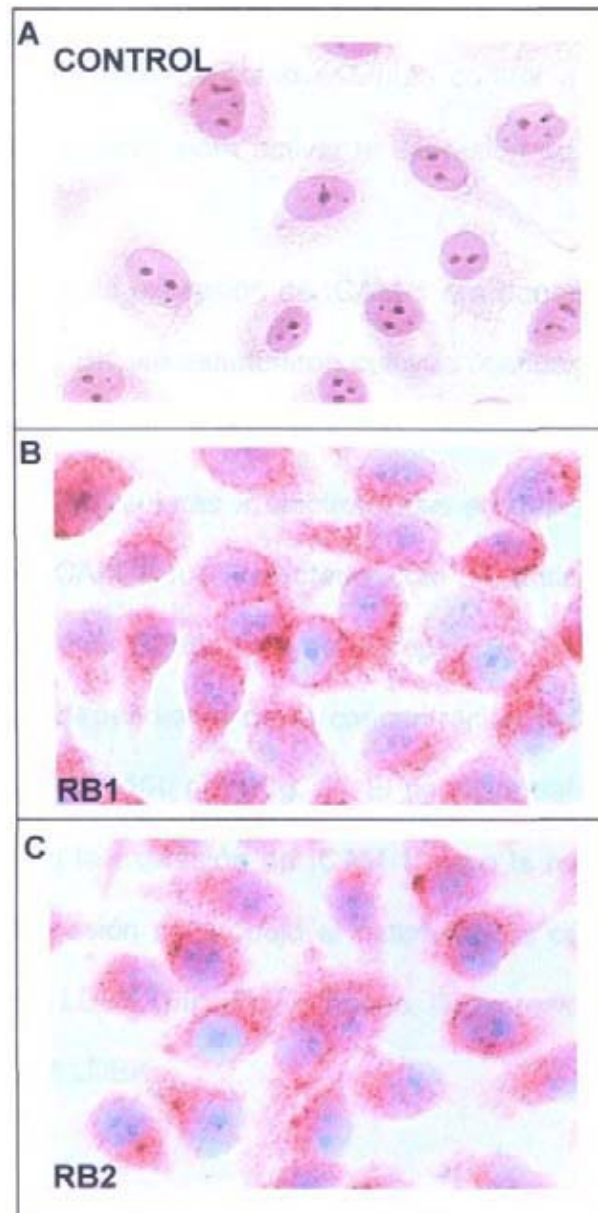


Fig. 4. Inmunolocalización de receptores B₁ y B₂ de cininas en células endoteliales EA.hy926 en cultivo. A) control en que se reemplazó el anticuerpo x suero no-inmune de la misma especie a una dilución 1:10.000. B) Inmunolocalización del receptor B₁ de cinina. C) Inmunolocalización del receptor B₂ de cinina. Se utilizaron anticuerpos anti-RB₁ y anti-RB₂ a una dilución 1:400 y 1:10.000, respectivamente y la peroxidasa se reveló con aminoetilcarbazol. Todas las figuras x 650.

4.2 La expresión de ICAM-1 depende de la concentración de LDBK y BK

La citoquina $\text{TNF}\alpha$, usada como estímulo control a una concentración de 10 ng/ml, fue un estímulo potente para activar la expresión de ICAM-1 en la línea celular EA.hy926 (**Fig. 5**).

Para determinar si la expresión de ICAM-1 era dependiente de la concentración de los péptidos LDBK y BK, se estimularon cultivos confluentes de células endoteliales con diferentes concentraciones durante 6 h. Las proteínas (100 μg) de los extractos de células endoteliales fueron sujetas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, electrotransferidas e ICAM-1 fue detectado con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína humana. El agonista del receptor B_2 BK produjo un aumento en la expresión de ICAM-1, dependiente de la concentración del péptido. La expresión fue máxima cuando se usó BK 100 nM (**Fig. 5**). El agonista del receptor B_1 LDBK también produjo un aumento en la expresión de ICAM-1, pero la respuesta fue diferente dado que el máximo de expresión se produjo al estimular las células endoteliales con una concentración de 1 nM LDBK (**Fig. 5**). De hecho, la expresión de la proteína disminuyó al estimular con 100 nM LDBK.

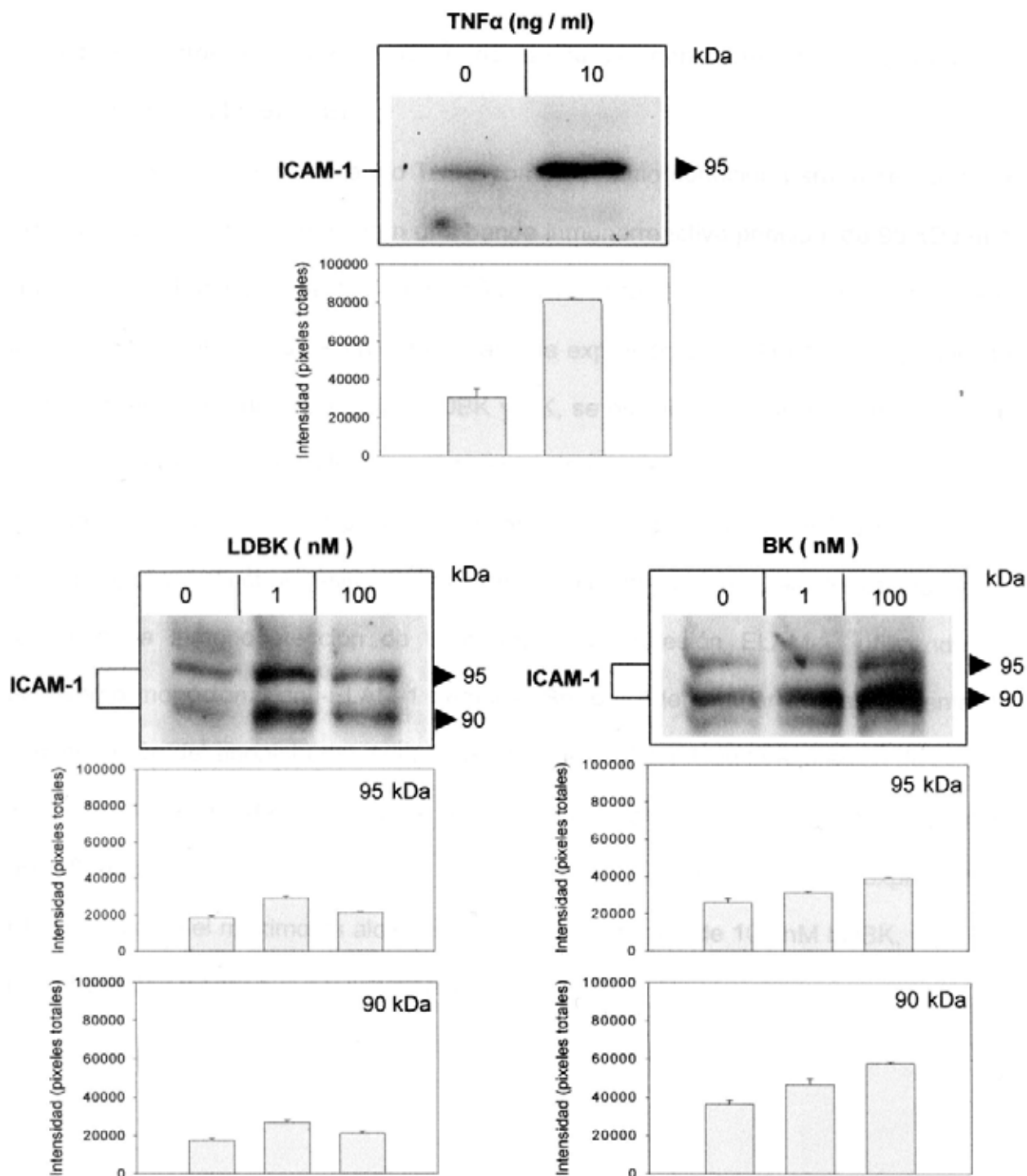


Fig. 5. Expresión de ICAM-1 en células endoteliales de la línea EA.hy926. Las células fueron estimuladas por 6 h con dosis variables de TNF α , LDBK y BK, respectivamente. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 10%, transferidas a inmobilón P y luego incubadas con un anticuerpo anti-ICAM-1, el cual fue detectado utilizando quimioluminiscencia.

4.3 La expresión de ELAM-1 depende de la concentración y del tiempo de estimulación con LDBK y BK

Los experimentos utilizando $\text{TNF}\alpha$ como estímulo conocido para incrementar la expresión de ELAM-1 demostraron una banda inmunorreactiva principal de 95 kDa que comenzaba a hacerse detectable cuando la concentración de la citoquina era igual o mayor a 10 ng/ml (**Fig. 6**). Para determinar si la expresión de ELAM-1 era dependiente de la concentración de los péptidos LDBK y BK, se estimularon cultivos confluentes de células endoteliales con diferentes concentraciones de LDBK y BK por 24 h. Una cantidad aproximada de 80 μg de proteínas de los extractos de células endoteliales fueron sujetos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, electrotransferidos y sometidos a inmunodetección de la proteína de adhesión ELAM-1, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-ELAM-1 humana. Se logró determinar que al aumentar la concentración del agonista del receptor B_2 BK aumentó también la expresión de ELAM-1, donde el máximo de expresión se alcanzó a una concentración 100 nM del péptido (**Fig. 6**). Por su parte, LDBK produce un efecto idéntico al de BK sobre la expresión de ELAM-1, donde el máximo es alcanzado a la concentración de 100 nM LDBK, pero con una intensidad menor a la producida por BK (**Fig. 6**).

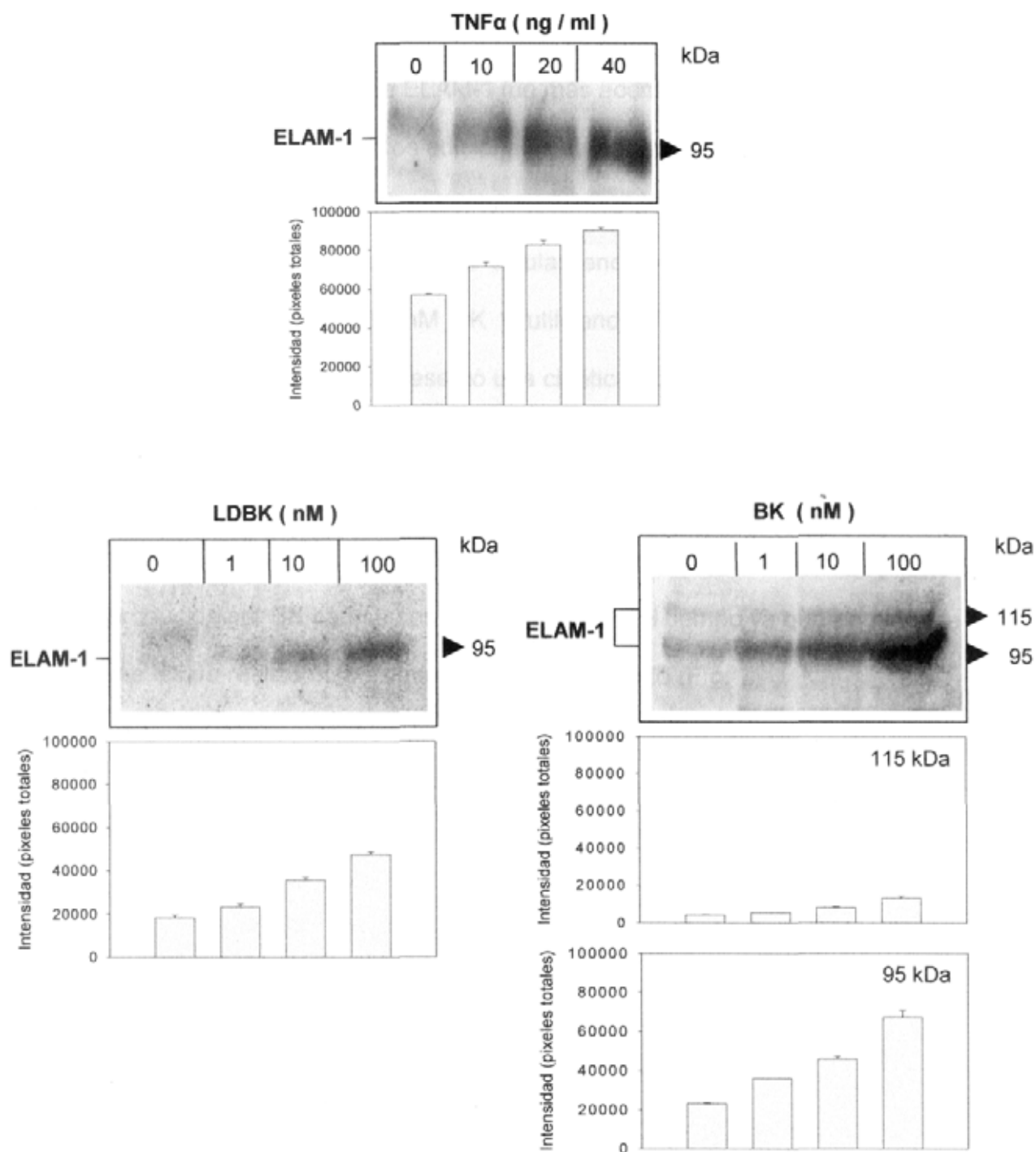


Fig. 6. Expresión de ELAM-1 en células endoteliales de la línea EA.hy926. Las células fueron estimuladas por 24 h con concentraciones variables de TNF α , LDBK y BK respectivamente. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 6%, transferidas a inmobilon P y luego incubadas con un anticuerpo anti-ELAM-1, el cual fue detectado utilizando quimioluminiscencia.

Dado que la expresión de ELAM-1 fue más acentuada con el agonista B₂ que con LDBK, se realizaron experimentos adicionales utilizando este péptido para determinar si la expresión de ELAM-1 era dependiente del tiempo de estimulación con BK. Para esto se estimularon cultivos confluentes de células endoteliales a diferentes tiempos, con una concentración fija de 100 nM BK y utilizando TNF α como control positivo. La molécula de adhesión ELAM-1 presentó una cinética de expresión máxima entre las 3 y 6 h de estimulación con TNF α (**Fig. 7**). Un resultado similar se observó cuando las células se estimularon con BK en que la máxima expresión de la proteína ocurrió también entre las 3 y 6 h de estimulación. A diferencia de lo ocurrido con TNF α , el efecto producido por BK parece ser más duradero en el tiempo ya que permanece hasta 24 h después de realizada la estimulación con el péptido (**Fig. 7**).

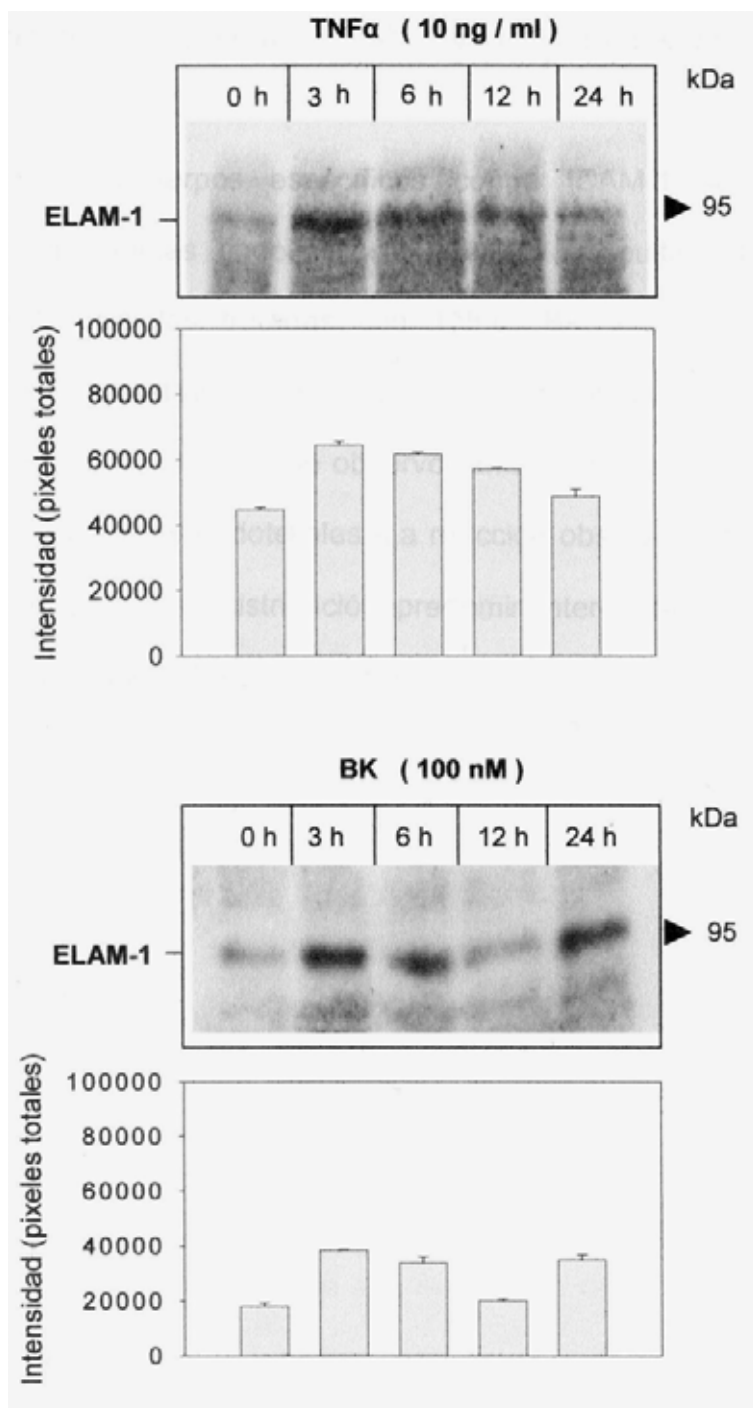


Fig. 7. Cinética de expresión de ELAM-1 en células endoteliales de la línea EA.hy926. Las células fueron estimuladas con TNF α y BK por periodos variables de tiempo. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 6%, transferidas a inmobilón P y luego, incubadas con un anticuerpo anti-ELAM-1, el cual fue detectado por quimioluminiscencia.

4.4 Evaluación de la expresión de ICAM-1 y ELAM-1 mediante inmunocitoquímica

4.4.1 ICAM-1

Utilizando anticuerpos específicos contra ICAM-1 se logró demostrar su expresión en las células endoteliales EA.hy926 en cultivo. La inmunocitoquímica muestra que las células tratadas con TNF α , BK y LDBK (**Fig. 8 B, C y D**, respectivamente) muestran reacción positiva para ICAM-1, no así las células no estimuladas (**Fig. 8 A**). ICAM-1 se observó tanto en la membrana celular como en el citoplasma de las células endoteliales. La reacción observada en el citoplasma era de aspecto granular con una distribución predominantemente en la región perinuclear, probablemente asociada al retículo endoplásmico.

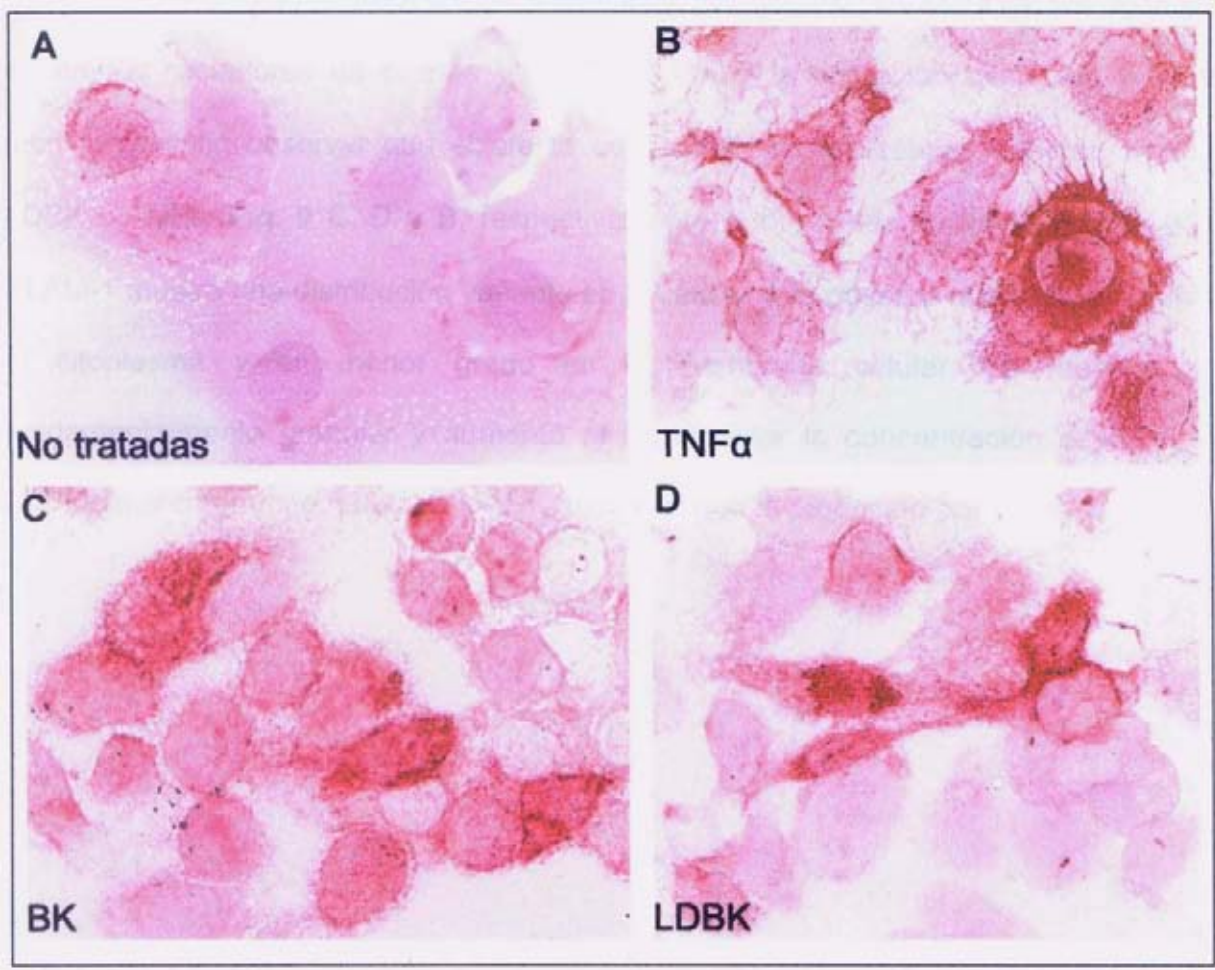


Fig. 8. Inmunolocalización de ICAM-1 en células endoteliales de la línea EA.hy926. A) células no estimuladas; B) células estimuladas con TNF α ; C) células estimuladas con BK; D) células estimuladas con LDBK. Se utilizó un anticuerpo anti-ICAM-1 humana a una dilución de 1:1600 y la peroxidasa se reveló con aminoetilcarbazol.

4.4.2 ELAM-1

Mediante inmunocitoquímica se comprobó el efecto estimulador de los agonistas de ambos receptores de cininas y de $\text{TNF}\alpha$ sobre la expresión de ELAM-1. Esta técnica permitió observar que el efecto ocurre sólo en las células tratadas con BK, LDBK o $\text{TNF}\alpha$ (**Fig. 9 C, D y B**, respectivamente) y no en las no tratadas (**Fig. 9 A**). ELAM-1 mostró una distribución variable en la célula, y se observó mayoritariamente en el citoplasma y en menor grado en la membrana celular. La reacción fue fundamentalmente granular y aumentó al incrementar la concentración de BK y de LDBK. Aparentemente, el efecto de BK es mayor que el producido por LDBK.

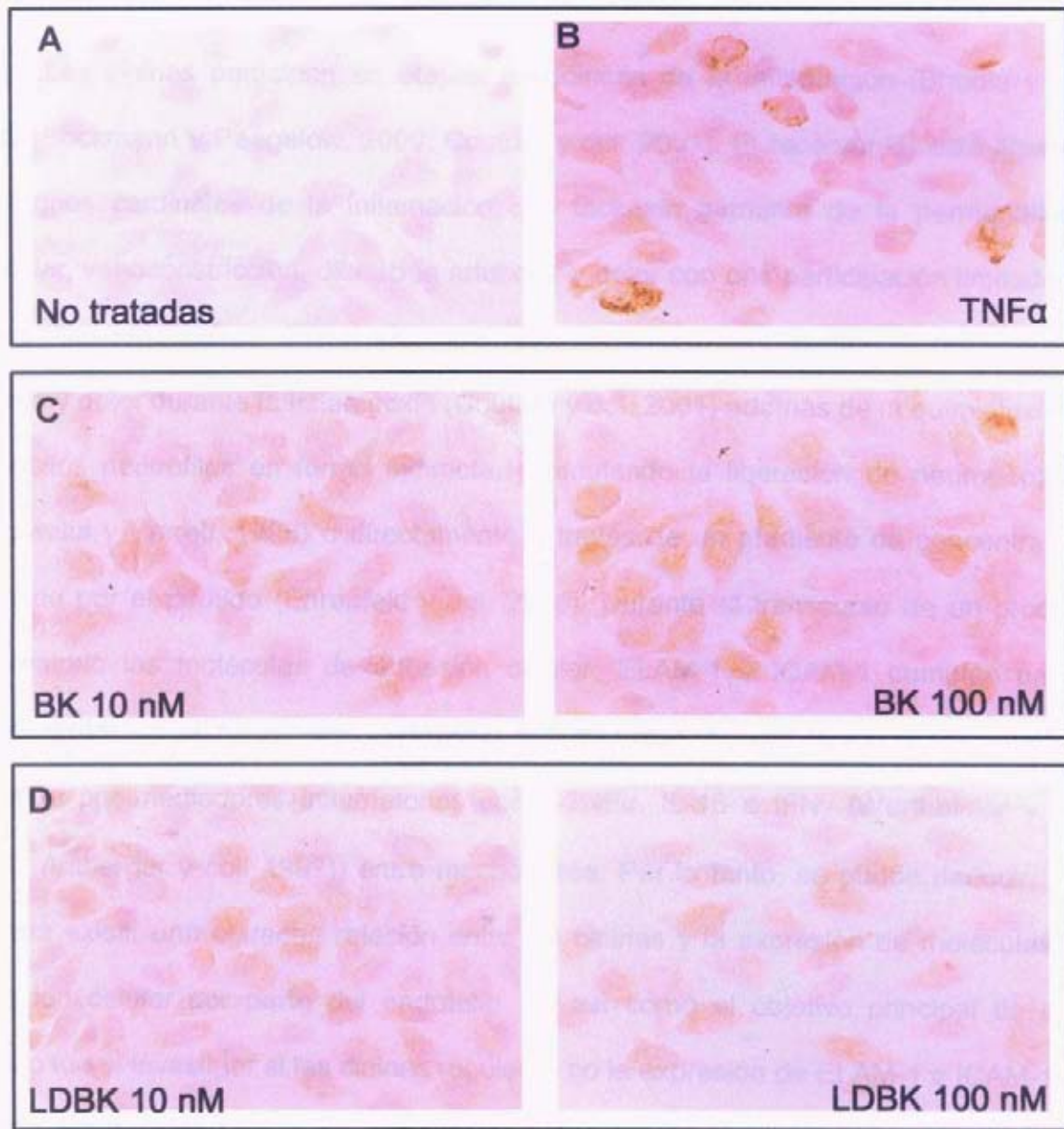


Fig. 9. Inmunolocalización de ELAM-1 en células endoteliales de la línea EA.hy926. A) células no tratadas; B) células estimuladas con TNF α ; C) células estimuladas con BK 10 y 100 nM; D) células estimuladas con LDBK 10 y 100 nM. Se utilizó un anticuerpo anti-ELAM-1 humana a una dilución de 2 μ g/ml y la actividad de la peroxidasa se reveló utilizando diaminobenzidina.

5. DISCUSION

Las cininas participan en etapas específicas de la inflamación (Bhoola y col. 1992; Bockmann y Paegelow, 2000; Couture y col. 2001). El receptor B₂ está ligado a los signos cardinales de la inflamación que incluyen aumento de la permeabilidad vascular, vasoconstricción, dilatación arteriolar y dolor con una participación limitada en el reclutamiento celular en el sitio inflamado. A su vez el receptor B₁ promueve el edema y dolor durante la inflamación (Couture y col. 2001) además de la quimiotaxis de leucocitos neutrófilos en forma indirecta, estimulando la liberación de neuropéptidos (Ahluwalia y Perreti, 1996) o directamente a través de un gradiente de concentración formado por el péptido (Ehrenfeld y col. 2006). Durante el transcurso de un proceso inflamatorio las moléculas de adhesión celular, ELAM-1 e ICAM-1 cumplen un rol fundamental en el rodamiento, adhesión y transmigración del leucocito al endotelio activado por mediadores inflamatorios como TNF α , IL-1 β e IFN γ (Wertheimer y col. 1992; Amberger y col. 1997)) entre mucho otros. Por lo tanto, se puede deducir, que debería existir una estrecha relación entre las cininas y la expresión de moléculas de adhesión celular por parte del endotelio. Es así como el objetivo principal de este trabajo fue el investigar si las cininas regulan o no la expresión de ELAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales en cultivo.

5.1 Expresión de receptores B₁ y B₂ de cininas en células endoteliales EA.hy926

Utilizando inmunocitoquímica y anticuerpos específicos para ambos receptores de cininas, se logró demostrar su expresión en células endoteliales de la línea

EA.hy926. Los receptores de cininas presentan una distribución similar en la célula, inmunolocalizándose tanto en el citoplasma como en la membrana celular. La reacción observada en el citoplasma era de aspecto granular con una distribución predominantemente en la región perinuclear. Wohlfart y col. (1997) demostraron la expresión de los RNA mensajeros de ambos receptores de cininas en la línea celular HUVEC, utilizando RT-PCR acoplado a Southern Blotting.

5.2 Las cininas BK y LDBK inducen la expresión de ICAM-1

ICAM-1 es una glicoproteína de transmembrana que promueve la firme adhesión y migración transendotelial del leucocito al endotelio durante la inflamación, cuya ruta puede ser transcelular y paracelular (Stanley y col. 2000; Yang y col. 2005). Está constitutivamente presente en bajos niveles en la superficie de la célula endotelial (Quinlan y col. 1998), sin embargo, citoquinas y componentes de la pared celular de bacterias Gram (+) pueden estimular su expresión. La estimulación de cultivos confluentes de células endoteliales de la línea EA.hy926 con BK, agonista del receptor B₂ de cininas, produjo un aumento en la expresión de ICAM-1. Este incremento fue proporcional al aumento de la concentración de BK, donde el máximo se alcanzó a una concentración 100 nM del péptido. Otras sustancias como IFN γ también provocan un efecto dosis-dependiente en células endoteliales derivadas de vena umbilical humana (HUVEC) similar al observado con BK (Melrose y col. 1998). Las células utilizadas en este trabajo provienen de las células HUVEC que fueron fusionadas con una célula de hibridoma para generar esta línea celular (Edgell y col. 1983). Por su parte, LDBK, un agonista del receptor B₁, también produjo un aumento en la expresión de ICAM-1, pero

la respuesta fue diferente. Fue así como el máximo de expresión se produjo al estimular con LDBK 1nM, mientras que una concentración 100 nM del péptido provocó un mínimo aumento en la expresión de esta molécula de adhesión. En la línea celular HLMVEC al estimular con ácido lipoteichoico de *Staphylococcus aureus*, también se observó un efecto de dosis-dependiente similar con respecto a ICAM-1 (Blease y col. 1999).

Las bandas inmunorreactivas detectadas tenían diferentes masas moleculares. Fue así como al estimular con TNF α se obtuvo una banda de 95 kDa mientras que la estimulación de las células con LDBK y BK generó dos bandas, una de 95 kDa y otra menor de 90 kDa. En la literatura se describen diferentes formas moleculares que van entre 90 a 110 kDa y que corresponden a distintos grados de glicosilación de la proteína (Diamond y col. 1990). Por lo tanto, los distintos anticuerpos comerciales disponibles pueden reconocer distintas formas glicosiladas de ICAM-1.

5.3 Inmunolocalización de ICAM-1

Mediante inmunocitoquímica y utilizando anticuerpos específicos contra ICAM-1 se logró demostrar su expresión en células endoteliales en cultivo. Los resultados de la inmunocitoquímica muestran que las células endoteliales tratadas con TNF α , BK y LDBK tienen reacción positiva para ICAM-1, no así las células no tratadas. ICAM-1 se observó tanto en la membrana celular como en el citoplasma, además de una reacción granular que es posible que esté asociada al retículo endoplásmico rugoso. Esto concuerda con estudios previos realizados por Bhunia y col. (1998), quienes demostraron mediante inmunofluorescencia la localización de ICAM-1 en células endoteliales en cultivo utilizando la misma línea celular EA.hy926. Detectándose una

intensa inmunorreactividad para ICAM-1 en la membrana celular y también en el citoplasma.

5.4 BK y LDBK inducen la expresión de ELAM-1

ELAM-1 es una glicoproteína de transmembrana que se expresa sólo en el endotelio (Bevilacqua y Nelson, 1993) y media el rodamiento y la adhesión de leucocitos al endotelio activado por citoquinas (Bochner y col. 1991; Abbassi y col. 1993; Ulfman y col. 1999; Forlow y Ley, 2001). La estimulación realizada a los cultivos confluentes de células endoteliales de la línea EA.hy926 con BK produjo un aumento en la expresión de ELAM-1, al aumentar la concentración de BK aumentó también la expresión de ELAM-1, alcanzándose el máximo de expresión a una concentración 100 nM. Por su parte, el agonista B₁ LDBK provocó un efecto idéntico al de BK. Estudios previos utilizando ELISA han mostrado un efecto dosis-dependiente similar al estimular células HUVEC con diferentes concentraciones de TNF α e IL-1 (Melrose y col. 1998).

La masa molecular relativa de ELAM-1 varió distinguiéndose bandas inmunoreactivas de distinto tamaño. Por ej. Al estimular las células con TNF α se obtuvo una masa correspondiente a 95 kDa, mientras que con BK y LDBK se obtuvo masa de 115 y/o 95 kDa. Estudios previos realizados por Bevilacqua y col. (1987) en células HUVEC activadas con IL-1 β recombinante humana, demostraron usando inmunoprecipitación y electroforesis en gradiente, la expresión de dos polipéptidos (115 kDa, especie mayor y 97 kDa, especie menor) correspondientes a ELAM-1. Estos resultados fueron confirmados mediante experimentos de “pulso-caza” que sugiere que las especies menores de 97 kDa se originan de un precursor del polipéptido de mayor

tamaño. Los tamaños moleculares de ELAM-1 obtenidos en esta tesis son plenamente concordantes con los de Bevilacqua y col. (1987).

ELAM-1 presentó una expresión máxima luego de 3 a 6 h de estimulación con BK, manteniéndose a lo menos por las 24 h. Una expresión similar fue detectada mediante Inmunofluorescencia en células endoteliales microvasculares de dermis humana (HDMEC) por Vora y col. (1996) en respuesta a IL-10. Cabe resaltar que esta citoquina también produce una persistencia en la expresión de ELAM-1 hasta las 24 h post-estímulo, a diferencia de los resultados obtenidos por Amberger y col. (1997) quienes mediante el análisis de citometría de flujo en células endoteliales originadas de venas y arterias humanas muestran que ELAM-1 no presenta una persistencia en la expresión hasta 24 h post-estímulo con $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y LPS, por el contrario, se produce una disminución de su expresión.

5.5 Inmunolocalización de ELAM-1

Utilizando inmunocitoquímica y anticuerpos específicos contra ELAM-1 se logró demostrar su distribución en células endoteliales en cultivo. Las células tratadas con $\text{TNF}\alpha$, BK y LDBK mostraron reacción positiva para ELAM-1, no así las células no tratadas. ELAM-1 mostró una distribución variable en la célula, inmunolocalizándose tanto en la membrana celular como en el citoplasma, además de una reacción granular. Al aumentar la concentración de BK, también aumentó la expresión de ELAM-1, un efecto similar se produjo al estimular con LDBK. Esto concuerda con estudios previos realizados por Vora y col. (1996), quienes demostraron mediante Inmunofluorescencia

la localización de ELAM-1 en células endoteliales microvasculares de dermis humana tratadas con citoquinas.

En resumen, nuestros resultados demuestran que las cininas, vía receptores B₁ y B₂, regulan la expresión de moléculas de adhesión celular ICAM-1 y ELAM-1 en células endoteliales en cultivo. Avanzar en la caracterización de los complejos procesos inflamatorios, nos llevará a futuro a proveer nuevas estrategias para modular el curso de diversas enfermedades asociadas a la inflamación.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbassi, O., Kishimoto, T.K., Mcintire, L.V., Anderson, D.C. and Smith, C.W. (1993) E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J. Clin. Invest.*, **92**: 2719-2730.

Ahluwalia, A., and Perreti, M. (1996) Involvement of bradykinin B₁ receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 β in vivo in the mouse. *J. Immunol.*, **156**: 269-274.

Amberger, A., Maczek, C., Jürgens, G., Michaelis, D., Schett, G., Trieb, K., Eberl, T., Jindal, S., Xu, Q. and Wick, G. (1997) Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. *Cell Stress & Chaperones.*, **2**: 94-103.

Bevilacqua, M.P., Poher, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A. (1987) Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 9238-9242.

Bevilacqua, M.P. and Nelson, R.M. (1993) Selectins. *J. Clin. Invest.*, **91**: 379-387.

Bhoola, K.D., Figueroa, C.D. and Worthy, K. (1992) Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacol. Rev.*, **44**: 1-80.

Bhunja, A.K., Arais, T., Bulkley, G. and Chatterjee, S. (1998) Lactosylceramide mediates tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression

and the adhesion of neutrophil in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **273**: 34349-34357.

Blais, C., Mareau, F., Rouleau, J-L., Adam, A. (2000) The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides.*, **21**: 1903-1940.

Blease, K., Chen, Y., Hellewell, P.G. and Burke-Gaffney, A. (1999) Lipoteichoic acid inhibits lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression and IL-8 release in human lung microvascular endothelial cells. *J. Immunol.*, **163**: 6139-6147.

Bochner, S.B., Luscinskas, F.W., Gimbrone, M.A., Newman, W., Sterbinsky, S.A., Derse-Anthony, C.P., Klunk, D. and Schleimer, R.P. (1991) Adhesion of human basophils, eosinophils and neutrophils to interleukin- 1 activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J. Exp. Med.*, **173**: 1553-1556.

Bockmann, S., Paegelow, I. (2000) Kinins and Kinin receptors: importance for the activation of leucocyte. *J. Leukoc. Biol.*, **68**: 587-592.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **7**: 248-254.

Burch, R.M. and Kyle, D.J. (1992) Recent developments in the understanding of bradykinin receptors. *Life Sci.*, **50**: 829-838.

Colden-Stanfield, M., Schilling, W.P., Ritchie, A.K., Eskin, S.G., Navarro, L.T., Kunze, D.L. (1987) Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ion currents bovine aortic endothelial cells. *Circ. Res.*, **61**: 632-640.

Couture, R., Harrison, M., Vianna, R.M., Cloutier, F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, **429**: 161-176.

Diamond, D.S., Staunton, D.E., Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L., and Springer, T.A. (1990) ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell. Biol.*, **111**: 3129-3139.

Edgell, C.J.S., McDonald, C.C., Graham, J.B. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hibridation. *P.N.A.S.*, **80**: 3734-3737.

Ehrenfeld, P., Millan, C., Matus, C.E., Figueroa, J.E., Burgos, R.A., Nualart, F., Bhoola, K.D. and Figueroa, C.D. (2006) Activation of kinin B₁ receptors induces chemotaxis of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, **80**: 117-124.

Erdos, E.G. (1979) kininases. In bradykinin, kallidin and kallikrein. *Handbook. Exp. Pharmacol.*, **25** (Suppl): 427-487.

Fernandez-Patrón, C., Zouki, C., Whittal, R., Chan, J.S., Davidge, S.T. and Filep, J.G. (2001) Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endotelin-1[1-32]. *FASEB J.*, **15**: 2230-2240.

Figueroa, C.D., Marchant, A., Novoa, U., Forstermann, U., Jarnagin, K., Scholkens, B., Muller-Esterl, W. (2001) Differential distribution of bradykinin B₂ receptors in the rat and human cardiovascular system. *Hypertension*, **37**: 110-120.

Figueroa CD, Gonzalez CB, Grigoriev S, Abd Alla S, Haasemann M, Jarnagin K, Müller-Esterl W (1995) Probing for the bradykinin B₂ receptor in rat kidney by anti-peptide and anti-ligand antibodies. *J Histochem Cytochem* **43**:137-148.

Forlow, S.B. and Ley, K. (2001) Selectin-independent leukocyte rolling and adhesion in mice deficient in E-, P-, and L-selectin and ICAM-1. *Am. J. Physiol. Heart. Circ.*, **280**: H634-H641.

Gafford, J.T., Skidgel, R.A., Erdos, E.G., Hersh, L.B. (1983) Human kidney "enkephalinase" a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry.*, **22**: 3265-3271.

Hall, J.M. (1992) Bradykinin receptors: Pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.*, **56**: 131-190.

Hess, J.F., Derrick, A.W., MacNeil, T., Borkowski, J.A. (1996) The agonist selectivity of a mouse B₁ bradykinin receptor differs from human and rabbit B₁ receptors. *Immunopharmacol.* **33**: 1-8.

Laemli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond).*, **227**: 680-685

Leeb-Lundberg, F.M.L., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D.J., Zuraw, B.L. (2005) Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanism to patophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.*, **57**: 27-77

Marceau, F., Hess, J.F., Bachvarov, D.R. (1998) The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.*, **50**: 357-386.

McEachern, A.E., Shelton, E.R., Bhakta, S., Obernolte, R., Bach, C., Zuppan, P., Fujisaki, C., Aldrich, R.W., Jarnagin, K. (1991) Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 7724-7728.

McEver, R.P., Moore, K.L. and Cummings, R.D. (1996) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.*, **270**: 11025-11028.

Melrose, J., Tsurushita, N., Liu, G. and Berg, E.L. (1998) INF- γ inhibits activation-induced expression of E and P-selectin on endothelial cells. *J. Immunol.*, **161**: 2457-2464.

Mendelowitz, D., Bacal, K., Kunze, D.L. (1992) Bradykinin-activated calcium influx pathway in cultured bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **262**: H942-H948.

Menke, J.G., Borkowski, J.A., Bierilo, K.K., MacNeil, T., Derrick, A.W., Schneck, K.A., Ransom, R.W., Strader, C.D., Linemeyer, D.L. and Hess, F.J. (1994) Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**: 21583-21586.

Pastore, L., Tessitore, A., Martinotti, S., Toniato, E., Alesse, E., Bravi, M.C., Ferri, C., Desideri, G., Gulino, A., Santucci, A. (1999) Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *circulation.*, **100**:1646-1652.

Quinlan, K.L., Song, I-S., Bunnett, N.W, Letran, E., Stainhoff, M., Harten, B., Olerud, J., Armstrong, C.A, Caughman, S.W. and Ansel, J.C. (1998) Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. *Am. J. Physiol.*, **275** (*Cell Physiol*, *44*): C1580-C1590.

Regoli, D. and Barabé, J. (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, **32**: 1-46.

Robbins, A. M. (1994) Patología estructural y funcional. 5^a Ed. Interamericana McGRAW-HILL. 64-66.

Schini, V.B., Boulanger, C., Regoli, D. and Vanhoutte, P.M. (1990) Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B2 kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**: 581-585.

Silverman, M.D., Zamora, D.O., Pan, Y., Texeira, P.V., Planck, S.R. and Rosenbaum, J.T. (2001) Cell adhesion molecule expression in cultured human iris endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**: 2861-2866.

Smith, J.A., Webb, C., Holford, J., and Burgess, G.M. (1995) Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol. Pharmacol.*, **47**: 525-534.

Stanley, P., Mcdowall, A., Bates, P.A., Brashaw, J. and Hogg, N. (2000) The second domain of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) maintains the structural integrity of the leucocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) ligand-binding site in the first domain. *Biochem. J.*, **351**: 79-86.

Tiffany, C.W. and Burch, R.M. (1989) Bradykinin stimulates tumour necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *F.E.B.S. Lett.*, **247**: 189-192.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**: 4350-4354

Ulfman, L.H., Kuijper, P., Linden, J.A., Lammers, J-W., Zwaginga, J.J., Koenderman, L. (1999) Characterization of eosinophil adhesion to TNF α - activated endothelium under flow conditions: α_4 integrins mediate initial attachment, and E-selectin mediates rolling. *J. Immunol.*, **163**: 343-350.

Vora, M., Romero, L.I. and Karasek, M.A. (1996) Interleukin-10 induces E-selectin on small and large blood vessel endothelial cells. *J. Exp. Med.*, **184**: 821-829.

Wertheimer, S.J., Myers, C.L., Wallace, R.W. and Parks, T.P. (1992) Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **267**: 12030-12035.

Wirth, K., Hock, F.J., Albus, U., Linz, W., Alpermann, H.G., Anagnostopoulos, H., Henke, S., Breipohl, G., Konig, W., Knolle, J., Scholkens, B.A. (1991) Hoe 140: a new potent and long acting bradykinin antagonist: in vivo studies. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 774-777.

Wohlfart, P., Dedio, J., Wirth, K., Scholkens, B.A., and Wiemer, G. (1997) Different B1 kinin receptor expression and Pharmacology in endothelial cells of different origins and species. *J.P.E.T.*, **280**: 1109-1116.

Yang, L., Froio, R.M., Sciuto, T.E., Dvorak, A.M., Alon, R. and Luscinskas, F.W. (2005) ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF α -activated vascular endothelium under flow. *Blood.*, **106**: 584-592.