

Curso 2010/11
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/34
I.S.B.N.: 978-84-15287-62-9

ADA MARÍA HERRERA GARCÍA

**Implicación de receptores adrenérgicos
y moléculas de adhesión en modelos
de inflamación aguda**

Directores

**MANUEL FERIA RODRÍGUEZ
JOSÉ FEDERICO DÍAZ GONZÁLEZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A mis padres, hermanos y sobrinos.
A la memoria de mis abuelos y Tange Sazen.
A Ricardo... por todo.

*La ciencia es la encargada de
eslabonar las verdades sueltas que
la observación le presenta.*

Carlos J. Finlay
(Médico Cubano, 1833-1915)

*La investigación no tiene patria,
es de la humanidad entera.*

Mariano Barbacid
(Bioquímico Español, 1949-)

Agradecimientos:

Es difícil expresar lo agradecida que estoy por la oportunidad que me han dado. Poder trabajar por varios años realizando esta tesis doctoral, algo con lo que nunca había soñado. Valoro mucho lo logrado ya que la salida laboral para inmigrantes profesionales es mucho más difícil, y a pesar de ello se me dio esa oportunidad gracias al Dr. Federico Díaz González. Sinceramente, estoy inmensamente agradecida, no lo dude. No puedo dejar de mencionar a la Dra. Judith López, por sus buenos consejos, sus atenciones y, cómo no, porque ambos me han tratado muy amablemente a lo largo de estos años; gracias.

Al Dr. Manuel Fera Rodríguez, que ha tenido una labor muy importante en mi formación, no puede imaginar cómo le agradezco la ayuda que siempre me ha brindado y los conocimientos que me ha transmitido, aunque también han sido muy importantes todos esos días de alegría y buen humor con los que llenaba el laboratorio, con esos chistes, que aunque los repitiera me reía como la primera vez. Gracias por esas canciones que me transportaban a otra época como primera espectadora, o bien escuchándole en el pasillo, una manera muy armoniosa de saber que había llegado. Muchas gracias, porque es muy importante trabajar con alguien que contribuye a crear un ambiente de trabajo productivo.

Gracias a los médicos del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de Canarias, con los que he compartido durante estos años, (Sagrario, Iván, Juanjo, Elisa, Alberto, Juan Carlos, Sergio, Cristina, Sigrid, Vanesa, Esmeralda, Beatriz, Marian y Charo), por acogernos como parte del equipo y apoyarnos siempre.

Al colectivo de enfermeros del laboratorio central y paritorio del Hospital Universitario de Canarias, por su desinteresada contribución a esta investigación; especialmente a Teresa, Mari Carmen, Carmita, Bea, Cristo, María José, Oliver, Carmen y Ana.

A mis compañeras de equipo, Chus, Mayte y Ana, que durante estos años me han brindado el apoyo que he necesitado, gracias por **TODO**. No se imaginan cuanto me han ayudado. Han ejercido en muchas ocasiones como mis posdoctorales, aún sin serlo en esos momentos. Sin su ayuda las cosas me hubieran resultado muy complicadas, no lo olvidaré jamás. No puedo dejar de mencionar a Elsa, un ser humanamente entrañable y la mejor de las secretarías, que me ha facilitado tanto el trabajo, eres muy importante para el grupo, lo mejor de todo es que lo sabes. Juntas han sido parte importante durante este tiempo, tanto para mi formación, como para mi adaptación a esta tierra que me ha acogido, mil gracias chicas.

Le agradezco al personal de laboratorio del Dr. Francisco Sánchez Madrid del Hospital Universitario de La Princesa en Madrid, por haberme admitido amablemente durante mi estancia con ellos. Especialmente a Mariví, Vanessa, Carmen, Isidoro y especialmente a Olga, por su dedicación y delicadeza para conmigo en todo lo que necesité.

Al personal del estabulario de La Universidad de La Laguna que de una forma u otra han contribuido para poder desarrollar parte de este trabajo. Especialmente a la Dra. María Rosa, por su tacto y profesionalidad en todo momento.

Al Departamento de Medicina Física y Farmacología por acogerme y permitirme el desarrollo de este trabajo. A Begoña, por su eficiencia y buen carácter y a Rosa por su cordialidad y buen trato.

Al Dr. Ricardo Borges, por facilitarme el uso de su laboratorio, y además por todas las recomendaciones que me ha hecho. A los chicos que trabajan o han trabajado con él, (Mónica, Marcial, Yéser, Jessica, Bea, Gaby, Jose, Danny, Natalia, Marta y Miriam), todos me han aportado algo, unos conocimientos, otros mucho afecto, y casi todos ambas cosas; pero solo por haber sido amables conmigo ya me siento satisfecha.

Al Dr. Machado, gracias por la paciencia que has tenido conmigo, me esmeraré siempre para que no caiga en saco roto todos los conocimientos que me has aportado.

Al Dr. Valenzuela, por sus buenas recomendaciones y especialmente sus becarios, Jonathan y Laura, gracias por tantos momentos agradables. Esa risa inconfundible y contagiosa de Jony, las apuestas, concursos vario pintos e infinidad de ideas creativas que le dan vida al laboratorio y como no, sus conocimientos que tan bien me han venido.

Al Dr. Álvarez de la Rosa, por su disposición para aclararme las dudas que he tenido, siempre de una manera afable y didáctica. A sus becarios Iván y Alberto que me han brindado su ayuda, especialmente este último con un toque personal inconfundible.

A nivel familiar, quiero agradecer a mis padres (Juan y Ada), hermanos (Elisa y Juan Carlos), mis cuñados (Lucio y Giselle), mis padrinos (Benita y Remberto) y primas (Adriana y Elizabeth), por todo el apoyo que me han dado, en todos los sentidos, por confiar en mí y quererme siempre. Sé que soy privilegiada por tenerlos a todos conmigo aquí, son miles las familias de cubanos que están disgregadas por el mundo entero, y el haber podido compartir esta etapa de mi vida con ustedes ha sido muy importante, gracias.

No puedo dejar de mencionar a la familia que tengo en Cuba (Arcilda, Ana, Curró, Lorenzo, Lisset, Mariuska, Yohanis y Mario), por darme siempre cariño y apoyo. Especialmente a Rita y Yeya, por haber contribuido durante estos años con mensajes llenos de buenos consejos y optimismo para que no decajera el ánimo, han sido vitales.

En concordancia con la ética que todo ser humano, y especialmente un biólogo, debe practicar respecto a toda forma de vida, deseo reconocer la involuntaria pero decisiva participación de cientos de ratones de laboratorio, que han aportado lo máximo de sí al desarrollo de esta investigación, su contribución ha sido fundamental.

Por último y no menos importante a Ricardo,... **“que sería de mí sin tí”**..., esa frase que tanto nos gusta y tanto significado tiene. Gracias por estar siempre cuando te necesito. Esta tesis no hubiera sido una realidad sin tu incondicional ayuda. Una vez más puedo decir que doy gracias a Dios porque seas mi otro yo.

RESUMEN:

Muchos procesos que cursan con una respuesta inflamatoria anómala tienen en común una alteración de la regulación del sistema inmune y de las vías del stress. Dos vías de stress, el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y el sistema nervioso simpático regulan la respuesta inmune a través de la liberación de glucocorticoides y norepinefrina, respectivamente. La norepinefrina interacciona con receptores adrenérgicos (receptores α y β 1) expresados en la superficie de las células implicadas en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la implicación real de la señalización por estos receptores, los subtipos comprometidos y los mecanismos a través de los cuales las catecolaminas son capaces de influenciar la respuesta inflamatoria, no han sido esclarecidos. Datos preliminares de nuestro grupo evidencian que agonistas α 2 inhiben *in vivo* la acumulación de neutrófilos en un foco de inflamación, lo que sugiere que estos adrenoreceptores modulan la respuesta inflamatoria aguda. Durante el desarrollo de esta investigación se estudió la presencia de receptores α 2 adrenérgicos en neutrófilos humanos y células endoteliales. Se determinó el efecto de los agonistas α 2 sobre la respuesta inflamatoria *in vivo* mediante modelos animales. En modelos *in vitro* se estudió el efecto de los agonistas adrenérgicos α 2 sobre los mecanismos moleculares que intervienen en las diferentes fases de la respuesta inflamatoria.

En este trabajo presentamos datos que muestran que los PMN humanos expresan de forma constitutiva la subunidad α 2_A y las células endoteliales la α 2_B de los receptores adrenérgicos α 2. Además, estos receptores adrenérgicos parecen jugar un papel importante en los procesos iniciales de la cascada de adhesión. Nuestros datos sugieren que la estimulación de los receptores adrenérgicos α 2 hace a los neutrófilos menos sensibles a la activación por citoquinas y quimioquinas, previniendo la disminución en superficie de selectina-L y el movimiento de CD11b, y a nivel endotelial, la activación del receptor adrenérgico α 2 reduce la capacidad para sobreexpresar ICAM-1 en respuesta a TNF- α .

Nuestros datos sugieren que los agonistas adrenérgicos α 2 aumentan las interacciones intercelulares en las HUVEC, pudiendo interferir en los procesos de extravasación de PMN que requieren, en su última fase, la relajación de las uniones interendoteliales para permitir el paso de los leucocitos al foco inflamatorio. Esperamos que este trabajo aporte los datos experimentales básicos para el desarrollo de nuevos fármacos agonistas α 2 que puedan ser utilizados para la modulación de la respuesta inflamatoria patológica en humanos.

Ayudas personales y del grupo que han hecho posible la realización de esta investigación:

- **SAF2002-01634.** Ministerio de Ciencia y Tecnología.
- **FIS 04/1275.** Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo
- **Tecnólogo.** Consejería de Industria, Comercio y Nuevas Tecnologías
IDT-TF-2006/052
- **Tecnólogo.** Consejería de Industria, Comercio y Nuevas Tecnologías
IDT-TF-2007/079
- **FUNCIS** (Fundación Canaria de Investigación y Salud)
Ayuda a investigadores en formación, periodo 2009-2011.

ÍNDICE

ÍNDICE	9
ABREVIATURAS	12
INTRODUCCIÓN	15
1. Antecedentes.	16
2. Introducción a la respuesta inflamatoria.	18
2.1 Células que intervienen en el proceso inflamatorio.....	19
3. Polimorfonucleares neutrófilos (PMN).	20
3.1 Morfología.	21
3.2 Función.	21
3.3 Clasificación.	22
3.4 Papel de los PMN en el proceso inflamatorio.	23
4. Moléculas de adhesión que intervienen en el proceso inflamatorio. Eventos tempranos.	23
4.1 La Superfamilia de las Inmunoglobulinas.	25
4.2 La familia de las Selectinas.	27
4.3 La familia de las Integrinas.	30
4.4 La familia de las Cadherinas.	33
4.4.1 Características y función de las Cadherina.	33
4.5 La familia de las Mucinas.	34
5. Eventos tardíos del proceso inflamatorio (fagocitosis y degranulación).....	35
6. Cascada inflamatoria. Cambios hemodinámicos y activación endotelial.....	36
6.1 Rodamiento y activación de leucocitos.	37
6.2 Adhesión firme al endotelio.	38
6.3 Extravasación o diapédesis hacia el foco de la lesión.	39
7. Receptores adrenérgicos. Características generales.	39
7.1 Estructura de algunos agonistas adrenérgicos α_2	42
7.2 Distribución celular y función de receptores adrenérgicos α_2	42
7.3 Los receptores adrenérgicos en la respuesta inflamatoria.	44
8. Modelos animales de inflamación.	45
8.1 Modelos animales de inflamación aguda.	46
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	48
MATERIALES Y MÉTODOS	50
1. Células primarias.	51
1.1 Células endoteliales de cordón umbilicales humanos (HUVEC).	51
1.2 Células polimorfonucleares (PMN) humanas y murinas.....	52
2. Reactivos químicos.	52
2.1 Anticuerpos.	52
2.2 Otros reactivos.	53
3. Experimentos con agonistas y antagonista adrenérgicos α_2	53
4. Modelos animales de inflamación aguda.	54
4.1 Modelo Air Pouch (Bolsa de Aire).	54
4.1.1 Materiales para desarrollar el modelo "Air Pouch".	55
4.1.2 Método.....	55
4.2 Modelo peritonitis por Tioglicolato.	56
4.2.1 Materiales para desarrollar el modelo "peritonitis por Tioglicolato".	57
4.2.2 Método.....	57
5. Western blot.	57
6. Citometría de flujo.	59
7. Estudio de la expresión génica mediante RT-PCR.....	60
8. Estudio de movimientos de calcio en PMN humanos.	61
9. Estudio de apoptosis en PMN humanos.	61
10. Estudio <i>in vitro</i> de la resistencia eléctrica, permeabilidad y resistencia a la migración celular en endotelio vascular.	62
10.1 Resistencia eléctrica del endotelio vascular.	62
10.2 Estudio de la resistencia eléctrica del endotelio al paso de macromoléculas.....	62
10.3 Migración estática de PMN.	63
10.3.1 Materiales.....	63
10.3.2 Método.	64
11. Ensayos de interacción endotelio-neutrófilo en cámara de flujo.	64
11.1 Materiales	65
11.1.1 Tampones.	65

11.1.2	Componentes del sistema.	65
11.1.3	Método	66
11.1.4	Análisis de imágenes.	67
12.	Inmunofluorescencia.	67
13.	Análisis Estadístico.	68
RESULTADOS		69
1.	Expresión y funcionalidad de receptores adrenérgico α_2 en PMN y HUVEC.....	70
2.	Implicación de los receptores adrenérgicos α_2 en la extravasación de PMN en modelos animales de inflamación aguda.	73
3.	Efecto de los agonistas adrenérgicos α_2 sobre la expresión de moléculas de adhesión en PMN humanos.	76
4.-	Efecto de los agonistas adrenérgicos α_2 sobre la expresión moléculas de adhesión en HUVEC.	79
5.-	Evaluación de la capacidad apoptótica de los agonistas adrenérgicos α_2 sobre PMN humanos.	81
6.-	Efecto de los agonistas α_2 adrenérgicos sobre la resistencia eléctrica y el paso de macromoléculas a través de endotelio.	83
7.-	Efecto de la activación de receptores adrenérgicos α_2 endoteliales sobre la transmigración de PMN.	85
8.-	Implicación de los receptores adrenérgicos α_2 en la transmigración de los PMN a través del endotelio en condiciones dinámicas.	87
9.-	Efecto de los agonistas adrenérgicos α_2 sobre la expresión de VE-Cadherina en HUVEC.	90
DISCUSIÓN		93
CONCLUSIONES		102
BIBLIOGRAFÍA		104

Abreviaturas

Abreviaturas:

aa	Aminoácidos.
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo.
AR	Artritis reumatoide.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ATP	Adenosina trifosfato.
BSA	Albúmina sérica bovina.
CE	Células endoteliales
COX	Ciclooxigenasa.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
EGTA	Ácido tetraacético etilen glicol (agente quelante).
ELAM-1	Molécula de adhesión endotelio-leucocitaria.
ES	Error estándar.
FCS	Suero de ternero fetal.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
fMLP	Péptido formil-metionil-leucil-fenilalanina
G-CSF	Factor estimulador de colonias granulocíticas.
GDP	Guanosina difosfato.
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocítico-macrofágicas.
GTP	Guanosina trifosfato.
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution.</i>
HEPES	(4 (2-hydroxyethyl) - ácido 1-piperazineethanesulfónico).
HUVEC	Células endotelial de vena de cordón umbilical humana.
IC	Intracardiaca.
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1.
ICAM-2	Moléculas de adhesión intercelular-2.
IF	Inmunofluorescencia.
IFMr	Intensidad de fluorescencia media relativa.
IgG ₂	Inmunoglobulina 2.
IL-8	Interleuquina-8.
IM	Intramuscular.
IP	Intraperitoneal.
JAM	<i>Junctional adhesión molecules.</i>
LECAM-1	Molécula de adhesión de leucocitos (selectina-L).

LPS	Lipopolisacárido.
MAC	Molécula de adhesión celular.
MadCAM1	Molécula de adhesión de células de la mucosa.
ML	Músculo liso.
PBS	Tampón fosfato.
PECAM-1	Molécula de adhesión entre plaqueta y endotelio.
PMA	Miristato acetato de forbol.
PMN	Polimorfonucleares.
PSGL-1	Ligando glicoprotéico-1 de la P-selectina.
Sel-L	L-selectina.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α .
VCAM-1	Molécula de adhesión a célula vascular-1.
VLA-4	Receptores de activación muy tardía de linfocitos.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes.

Desde su origen el hombre ha padecido dolencias inflamatorias, que ha intentado paliar utilizando múltiples alternativas terapéuticas. En el papiro de Ebers (1550 a. C.), uno de los papiros Egipcios más importantes que tratan temas médicos, se describen numerosas enfermedades, entre ellas las inflamatorias, y a las que designa con el término “hinchazón”. En este texto se describen signos típicos de los procesos inflamatorios, como la producción de secreciones purulentas. Generalmente, los antiguos egipcios no tocaban ciertas “hinchazones” por considerar que contenían el “demonio” causante de la enfermedad [1], y las que se decidían a tratar lo hacían empleando remedios naturales a base de corteza de *Salix alba* (sauce blanco) [2] o *Glycyrrhiza glabra*, conocida también como raíz dulce, entre otros. Los efectos antiinflamatorios de estas plantas han sido también empleados desde antiguo por la medicina tradicional china [3].

En los pueblos del antiguo Oriente la medicina estaba vinculada en gran medida a la religión. De ahí que una visión menos terrenal de la inflamación se puede encontrar en los textos bíblicos: ...*Jehová te herirá de tisis, de fiebre, de inflamación y de ardor...* (Deuteronomio, 28:22).....*Y cuando en la piel de la carne hubiere divieso, y se sanare, y en lugar del divieso hubiera una hinchazón, o una mancha blanca rojiza, será mostrado al sacerdote...* (Levítico, 13:18-19).

En muchas culturas antiguas, principalmente en la griega y en toda la medicina precientífica previa al siglo XVIII, se consideró al proceso inflamatorio como propio de una enfermedad específica. Consideraban que la persona tenía el mal de la inflamación y su principal tratamiento y prevención eran las sangrías [4]. En la Grecia de Hipócrates se hicieron importantes observaciones sobre las manifestaciones externas de la inflamación, algunas de las cuales continúan siendo válidas; el término “erisipela”, literalmente enrojecimiento de la piel, y “edema”, en alusión a la acumulación de líquido [5]. Durante esa época la escuela médica de Praxágoras de Cos utilizaba infusiones de corteza de sauce para el tratamiento de la fiebre y el dolor [6]. Las propiedades de esta planta también fueron empleadas para calmar el dolor por los discípulos de

Aristóteles [2, 7]. Así, la medicina natural comenzó a adquirir un carácter científico; el ácido salicílico, principio activo de la corteza del sauce y base química de la aspirina, es probablemente uno de los pocos medicamentos cuyos precedentes se remontan hasta los mismos orígenes de la historia de la humanidad.

Durante la Edad Media y hasta bien entrado el siglo XVIII, el poder analgésico de la corteza de sauce cayó en un olvido relativo, cediendo terreno ante el opio [7, 8]. No fue hasta el año 1763 en el que el reverendo Edward Stone presentó en la Real Sociedad de Medicina Inglesa un informe en el que detallaba el éxito obtenido en 50 pacientes donde había empleado la corteza del sauce blanco para reducir la fiebre [2].

En el siglo XIX se hicieron importantes aportaciones que contribuyeron al conocimiento del proceso inflamatorio. Julius Cohnheim en 1867 realizó la primera descripción microscópica revelando el fenómeno de la vasodilatación, los cambios de flujo sanguíneo, la migración leucocitaria a través de las paredes de la microvasculatura y su influencia en la producción de edema [9, 10]. En ese mismo marco histórico, también fueron importantes las investigaciones desarrolladas por Rudolf Virchow respecto a la pérdida de la función en el miembro afectado por la inflamación [10, 11]. Metchnikoff, destacó el papel de la fagocitosis (teoría celular), Paul Ehrlich, fue el máximo defensor de la teoría humoral, y Thomas Lewis estableció un postulado del papel mediador de las diversas sustancias inducidas localmente por la lesión, las cuales tenían como consecuencia los cambios vasculares en la inflamación [10]. En 1898, un joven químico alemán que trabajaba para la casa farmacéutica Bayer en Alemania, Felix Hoffman, describió y patentó un método fiable para acetilar el ácido salicílico, dando lugar al primer antiinflamatorio no esteroideo (AINE), la aspirina. Los precursores de los AINE actuales, tal como ha ocurrido en los casos de otros muchos medicamentos, comenzaron utilizándose en la clínica a partir de evidencias puramente empíricas, hasta que se llegó a conocer una primera vía específica de acción metabólica que promovía la analgesia. En 1971, John Vane propuso como mecanismo de acción de la aspirina el efecto inhibidor de la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico por inhibición de la acción de la ciclooxigenasa (COX) [7, 12, 13], descubrimiento por el que fue

galardonado con el Premio Nobel de Medicina. También por la década de los 70, Smith y Willis, demuestran que el ácido acetil salicílico bloquea de forma irreversible la producción de tromboxano en las plaquetas humanas [14]. Hoy en día está bien establecido que la mayoría de los AINE son capaces de inhibir la síntesis de prostaglandinas y que este parece ser su principal mecanismo de acción antiinflamatoria [15]. Sin embargo, se han descrito múltiples acciones de estos compuestos no relacionadas con la inhibición de las COX que pueden participar en la explicación de su acción antiinflamatoria.

En la investigación médica moderna sobre inflamación se prioriza la obtención de compuestos similares a biológicos que bloqueen selectivamente pasos esenciales de la respuesta inflamatoria prevaleciendo la seguridad.

Aunque los principios básicos del fenómeno de la inflamación estaban entendidos ya a finales del siglo XIX, sin embargo, la plena comprensión de los mecanismos implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria continúa sin conseguirse aun en nuestros días.

2. Introducción a la respuesta inflamatoria.

La inflamación es una respuesta fisiológica al daño tisular exclusiva de los organismos pluricelulares e imprescindible para su supervivencia. El objetivo fundamental de este mecanismo de defensa es eliminar el agente causante del perjuicio y reparar el tejido dañado.

La respuesta inflamatoria es un proceso complejo en el que participan de forma coordinada diversos tipos celulares, moléculas de adhesión y mediadores químicos. Para que una respuesta inflamatoria sea eficaz deben acumularse en el tejido dañado leucocitos que se encuentran circulando por el torrente sanguíneo. En este proceso el endotelio vascular juega un papel esencial delimitando la zona de inflamación regulando las etapas tempranas y tardías de la respuesta inflamatoria. Todo el proceso está mediado por un grupo de moléculas de superficie celular que pertenecen fundamentalmente a tres familias de receptores de adhesión: 1) diversos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, 2) las selectinas y 3) las integrinas [16]. Otros autores plantean la importancia que tienen otras moléculas como 4) las VE-cadherinas y 5) mucinas [17, 18]. Estas moléculas interactúan de forma coordinada y secuencial

permitiendo que los leucocitos abandonen el torrente sanguíneos en zonas de daño tisular mediante un mecanismo denominado cascada de adhesión.

La respuesta inflamatoria se puede clasificar como aguda o crónica, dependiendo del tiempo de evolución y del tipo de células que se acumulen en los focos inflamatorios. En la respuesta aguda los polimorfonucleares (PMN) son las células que casi en exclusividad acuden al foco inflamatorio, mientras que en los procesos inflamatorios crónicos un porcentaje elevado de las células que infiltran los tejidos son linfocitos y macrófagos.

La respuesta inflamatoria no siempre es beneficiosa y puede llegar a causar daños irreparables en los tejidos cuando no se consigue eliminar el agente agresor, o cuando los mecanismos de regulación de la inflamación fracasan y esta se cronifica [19]. Múltiples enfermedades que tienden a acortar la esperanza de vida generando discapacidades severas en el ser humano tienen como base una alteración de la respuesta inflamatoria que ataca tejidos y órganos específicos de forma anómala y mantenida. Enfermedades como la colitis ulcerosa, la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple son procesos de naturaleza autoinmune en los que se produce una inflamación crónica en el intestino, la membrana sinovial o en el tejido neuronal. Esto justifica que uno de los retos actuales de la investigación biomédica sea el desarrollo de compuestos que permitan un mejor control del proceso inflamatorio.

2.1 Células que intervienen en el proceso inflamatorio.

El organismo de casi todos los mamíferos tiene un sistema especial para combatir los diferentes agentes infecciosos y tóxicos. Dicho sistema está compuesto de leucocitos sanguíneos (glóbulos blancos de la sangre) y de células derivadas, (**Figura 1**). Para evitar las enfermedades, todas ellas trabajan conjuntamente de dos formas: *a*) destruyendo directamente a los agentes invasores mediante fagocitosis y *b*) formando linfocitos sensibilizados y anticuerpos, que generalmente destruyen o inactivan al invasor.

Fue Paul Ehrlich en el año 1876 quien descubrió las diferencias de afinidad tintorial de los granulocitos, asignándoles el nombre de neutrófilos (colorantes neutros), eosinófilos (colorantes ácidos) y basófilos (colorantes básicos), estableciendo de esta manera las bases de la hematología moderna [10, 20]. Las

proporciones aproximadas de estas células en sangre son: Neutrófilos polimorfonucleares, 62%; Linfocitos, 30%; resto de células, 8%. La vida de los granulocitos es de 4 a 8 h circulando en la sangre y de 4 a 5 días en los tejidos. En los momentos de infección grave, este período se acorta a solo unas horas [21].

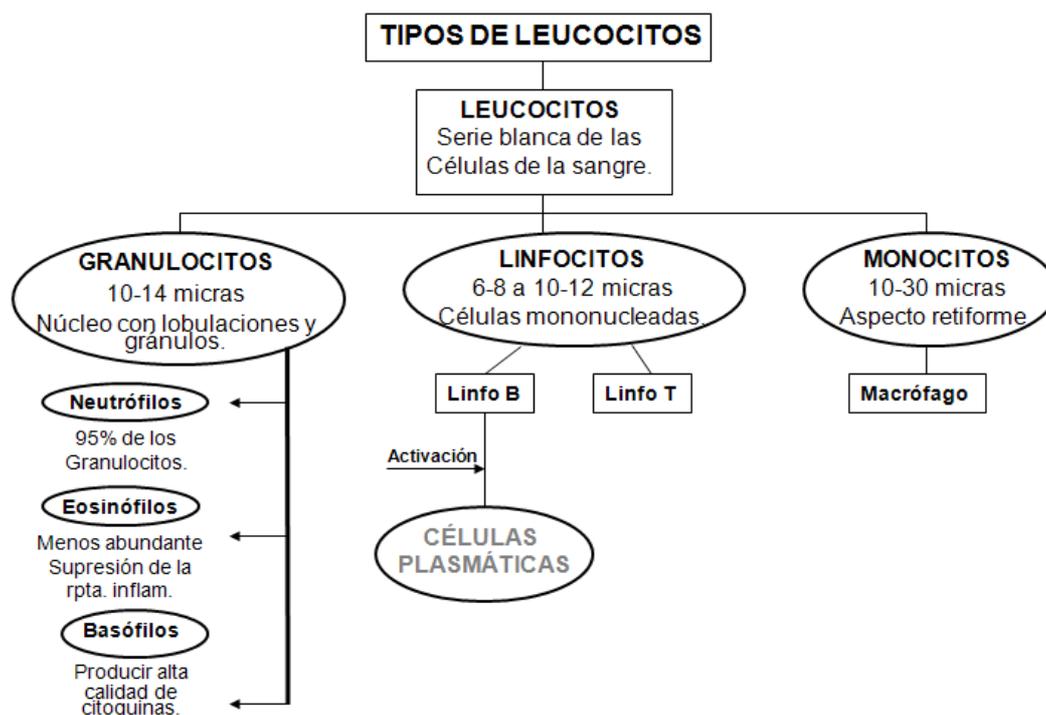


Figura 1. Leucocitos presentes en la sangre.

3. Polimorfonucleares neutrófilos (PMN).

Los neutrófilos son el tipo de leucocitos más abundante en la sangre periférica. Su origen es postmitótico, derivan de células pluripotenciales de la médula ósea y miden entre 12 y 18 μm [21].

La diferenciación de los PMN está controlada por citoquinas y factores de crecimiento hematopoyéticos [22]. Específicamente el G-CSF (factor estimulador de colonias granulocíticas) interviene en la maduración de los granulocitos y regula su supervivencia al influir sobre la frecuencia de apoptosis [23].

La importancia de los PMN es vital como línea de defensa, pero sus respuestas efectoras pueden dañar los tejidos del huésped y contribuir a la patogenia de múltiples enfermedades no infecciosas [10, 24].

Es indiscutible su importante papel como barrera contra las infecciones,

poniéndose de manifiesto de forma dramática las consecuencias clínicas que su déficit funcional tiene en el organismo, sobre todo en los casos de inmunodepresión o trastornos de la médula ósea.



Figura 2. Estructura de un PMN. Núcleo multilobulado y gránulos citoplasmáticos.

3.1 Morfología.

Los PMN presentan un núcleo con cromatina compacta segmentada con 2 a 5 lóbulos conectados por delgados puentes. En neutrófilos inmaduros el núcleo se presenta sin segmentar. Su citoplasma contiene abundantes gránulos finos con cuantiosas enzimas (**Figura 2**).

3.2 Función.

Los PMN son células altamente especializadas y su función más importante es la fagocitosis, que realizan a la par que los macrófagos. La ingestión puede ser tanto de elementos exógenos (cuerpos extraños, microorganismos) como endógenos (detritus tisulares) que puedan ser perjudiciales o inservibles para el organismo [23]. Se estima que un solo neutrófilo puede fagocitar de 3 a 20 bacterias antes de inactivarse y morir [21]. En la membrana contienen un grupo movilizable de proteínas de superficie que intervienen en la regulación de la respuesta inflamatoria [25].

Se conoce que una vez que los PMN están en el foco inflamatorio se pone en marcha un mecanismo de muerte programada. Además, se producen cambios en la superficie celular que los hace susceptibles a ser fagocitados por las células mononucleadas, contribuyendo a que el contenido celular se degrade sin que se lesione el medio interno. Estos procesos pueden verse alterados

retardando la apoptosis de los PMN, prolongando así su permanencia en la respuesta inflamatoria y contribuyendo parcialmente a su carácter crónico.

El paso de los neutrófilos desde los vasos sanguíneos al tejido está condicionado por la liberación de histamina (liberada por mastocitos) y TNF- α (liberada por macrófagos), las cuales actúan sobre las células del endotelio vascular, haciendo que se active y expresen moléculas que puedan ser reconocidas por los leucocitos circulantes.

Los neutrófilos que entran en los tejidos, son ya células maduras que pueden comenzar la fagocitosis de inmediato, proceso al que se hará referencia más adelante. Los neutrófilos contienen agentes bactericidas, como la fagocitina, que destruyen la mayor parte de las bacterias incluso cuando las enzimas lisosomales no las digieren [21, 23].

3.3 Clasificación.

Teniendo en cuenta sus características, los neutrófilos se clasifican en: tipo I y tipo II, **Tabla 1** [26].

TABLA 1: Clasificación de los neutrófilos.

Células Parámetros	Neutrófilos Tipo I	Neutrófilos Tipo II
Tamaño	Medio	Grande
Lóbulos	Regular	Irregular
Núcleo	Excéntrico	Excéntrico
Forma del Núcleo	Esférica	Esférica
Cromatina	Condensada en grumos	Condensada en grumos
Citoplasma	Claro	Cuerpos basófilos homogéneos
Granulación	Fina/salmón	Poca/azurófilos
Gránulos	Grandes y pequeños	Pequeños

Se pueden distinguir tres tipos de gránulos en los PMN, según la morfología y la tinción histoquímica que se emplee:

a) **Gránulos primarios o azurófilos:** Estos gránulos son ovales o redondos y varían en tamaño. Contienen bactericidas como la mieloperoxidasa y agentes antifúngicos [25].

b) **Gránulos secundarios o específicos:** No contienen peroxidasa pero sí lisozima, colagenasa, lactoferrina y otras enzimas [27].

c) **Gránulos terciarios o gelatinasa:** Son idénticos en tamaño a los gránulos específicos y poseen algunas proteínas en común con ellos, sin embargo, es significativa su alta cantidad de gelatinasa, una enzima con alta capacidad de destrucción de tejido [28].

d) **Vesículas secretoras:** Contienen en su superficie fosfatasa alcalina, proteínas plasmáticas derivadas de la endocitosis y su membrana es el principal reservorio de glicoproteínas de superficie [29].

3.4 Papel de los PMN en el proceso inflamatorio.

Como ya hemos comentado, una respuesta inflamatoria apropiada requiere de la acumulación de células efectoras (leucocitos) en los tejidos. Dicho proceso se puede dividir en funciones tempranas y tardías [30].

Los eventos tempranos son aquellos en los que el neutrófilo es reclutado a los sitios de inflamación incluyendo los procesos de adhesión, diapédesis y quimiotaxis. Se consideran eventos tardíos la: fagocitosis, degranulación, liberación de radicales libres y la producción de mediadores inflamatorios, los cuales están referidos a la activación neutrofílica.

El papel esencial de los PMN en la respuesta inflamatoria es 1) destruir los agentes causales y 2) el detritus celular. Sentando las bases para la *restitutio ad integrum*.

4. Moléculas de adhesión que intervienen en el proceso inflamatorio. Eventos tempranos.

El endotelio vascular de los vasos del tejido dañado es el responsable de señalar las zonas de inflamación. En estado de activación las células endoteliales dirigen la migración leucocitaria hacia el foco inflamatorio, proceso en el que juegan un papel esencial diversas moléculas de adhesión celular y mediadores solubles. La interacción física de los leucocitos circulantes con las células endoteliales (CE) de las vénulas poscapilares de los tejidos lesionados, ocurre gracias a la acción de moléculas de adhesión: las inmunoglobulinas, las selectinas, las integrinas, las cadherina y mucinas [17, 18] **Figura 3.**

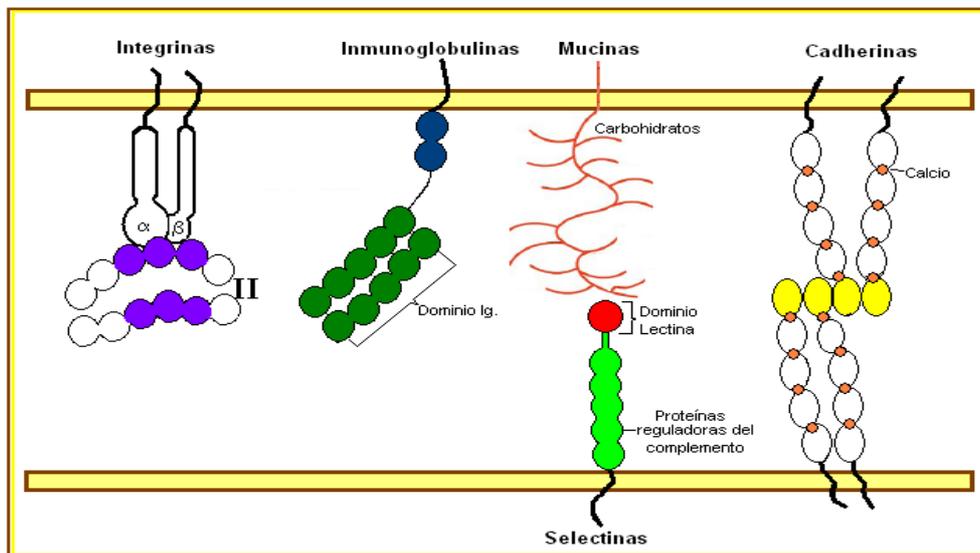


Figura 3. Familias de moléculas de adhesión.

Las moléculas de adhesión son proteínas que se expresan en la superficie de los leucocitos y de las células endoteliales; todas presentan una región que atraviesa la membrana celular y un dominio intracitoplasmático. Con frecuencia el dominio intercelular interacciona o conecta con el citoesqueleto de las células activadas, formando un complejo multimolecular. Permiten la interacción de las células entre sí y de estas, con la matriz extracelular. Sus ligandos son otras moléculas de adhesión, o ciertos carbohidratos de las células con las que interaccionan, o bien proteínas de la matriz extracelular normal o inflamada [23] ver **Figura 4**.

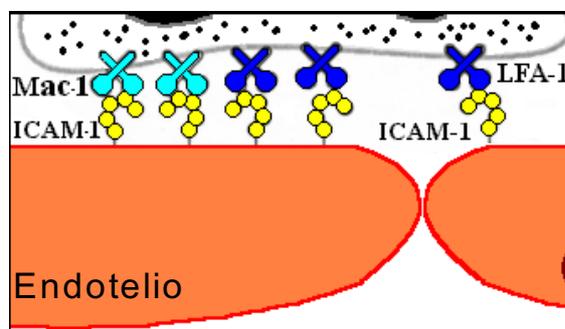


Figura 4. Unión firme de un leucocito al endotelio mediado por moléculas de adhesión.

Además de intervenir en la migración celular desde el torrente sanguíneo hacia los tejidos, las moléculas implicadas en la adhesión participan en varios

procesos. Juegan un papel esencial en los cambios de integridad del endotelio, en la reabsorción ósea, en la permanencia de las células inmunocompetentes en los tejidos, así como en las interacciones de las células involucradas en la actividad inmune.

Aunque el fenómeno de acumulación y extravasación de leucocitos se conoce hace más de un siglo, no ha sido hasta las últimas dos décadas que se ha reconocido el papel activo del endotelio vascular. En 1987, Lawrence y col. estudiaron la adhesión de neutrófilos a células endoteliales en condiciones de flujo bien definidas, previa estimulación por citoquinas [23]. La adhesión celular no sólo controla la localización física de las células, sino que también influye en sus funciones, modificando los programas celulares de expresión de genes, regulando la proliferación celular, o mediando la trans migración de señales al interior de la célula [28].

4.1 La Superfamilia de las Inmunoglobulinas.

Los miembros de esta familia de receptores se caracterizan por poseer dominios de inmunoglobulinas. Estos dominios los conforman estructuras de entre 90 y 100 amino ácidos plegados a modo de lazo y estabilizados gracias a la presencia de un puente disulfuro interno **Figura 5**. Reconocidas inicialmente en las inmunoglobulinas [31] y posteriormente en el receptor del linfocito T, estos dominios están ampliamente representados tanto en el sistema inmune, como son los antígenos de histocompatibilidad (clase I y II), el CD4, el CD2 y el LFA-3 o CD58 [32] y fuera del sistema inmune, como es el caso del NCAM o CD56, presente en células del sistema nervioso. Los anticuerpos y el receptor de los linfocitos T parecen haber evolucionado de un gen ancestral con dominio tipo inmunoglobulina.

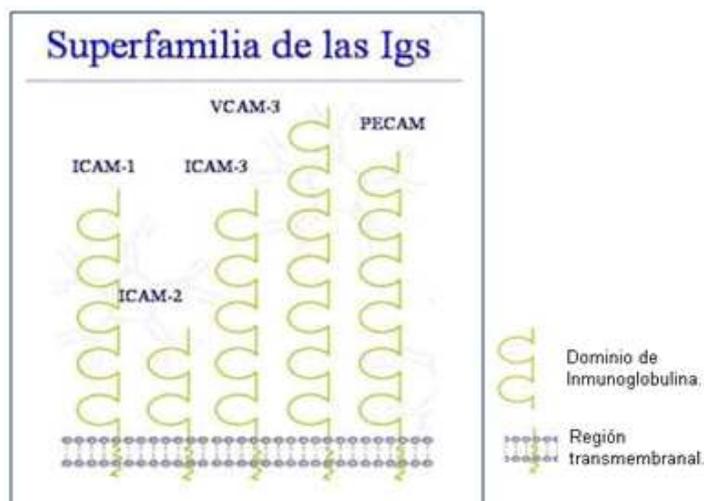


Figura 5. Estructura de las Inmunoglobulinas.

Varios miembros de esta familia de receptores se expresan en las células del endotelio y participan en la adhesión de los leucocitos como son: las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1 ó CD54 e ICAM-2 ó CD102), la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1 ó CD106), y la adhesina de mucosa-1 (MadCAM-1). Otros miembros de esta familia que se localizan en los bordes laterales de las células endoteliales y participan en el proceso de trans migración son la familia *JAM* (junctional adhesion molecule), -A, -B y -C, la molécula de adhesión entre plaqueta y endotelio-1 (PECAM-1 ó CD31) y el CD99.

Los receptores pertenecientes a la Superfamilia de la Inmunoglobulinas son capaces de unirse entre ellos para conectar células entre sí, así por ejemplo, el CD4 de los linfocitos T se une con las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad expresadas por las células presentadoras de antígeno o el LFA-3 que se une con el CD2, participando en los procesos de adhesión intercelular. Además, como se comentará más adelante, los miembros de esta familia de receptores también pueden unirse a miembros de otras familias de receptores de adhesión, así el LFA-1, una integrina $\beta 2$, se une con ICAM-1 [33] e ICAM-2 [34] y con miembros de la familia *JAM* [35] y el VLA-4, una integrina $\beta 1$, con el VCAM-1 [36].

Tabla 2. Familia de moléculas de adhesión (Inmunoglobulinas).

Moléculas de Adhesión	Localización	Expresión		Ligando	Función	Regulación
		Constitutiva	Inducida			
ICAM-1 (CD54)	Endotelio Fibroblastos Linfocitos Células Sinoviales, dendríticas.	Sí	Sí	CD11a/CD18 ($\alpha L\beta 2$) CD11b ($\alpha M\beta 2$) CD43	Adhesión Migración	Aumenta por IL-1, TNF- α , IFN- γ , LPS. Disminuye por IL-6.
VCAM-1 (CD106)	Endotelio Monocitos Células dendríticas, fibroblastos.	Sí	Sí	$\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) $\alpha 4\beta 7$ (LPAM-2)	Adhesión Migración	Aumenta por IL-1, TNF- α , IL-4, IL-13, LPS.
MAcAM-1	Endotelio intestinal	Sí	Sí	$\alpha 4\beta 7$ (LPAM-2) L-selectina	Adhesión Migración	Aumenta por IL-1, TNF- α , IFN- γ .
CD31 (PECAM-1)	Endotelio Leucocitos Plaquetas	Sí	No	CD31 $\alpha V\beta 3$ (CD51/CD61)	Adhesión Migración	Expresión constitutiva.
CD99	Endotelio Leucocitos	Sí	No	CD99 Algunas integrinas.	Migración	Expresión constitutiva.

4.2 La familia de las Selectinas.

Esta familia de receptores de adhesión interviene en las interacciones iniciales entre los leucocitos, las plaquetas y las células endoteliales [37]. Las selectinas son las responsables de establecer uniones lábiles entre las células circulantes y el endotelio, permitiendo que los leucocitos rueden sobre las paredes de los vasos en la dirección del flujo sanguíneo [38]. De esta forma, estos receptores juegan un papel esencial en la primera fase de la respuesta inflamatoria. Las tres selectinas conocidas hasta ahora, fueron descritas originariamente en plaquetas, leucocitos y en células endoteliales y se denominan con las letras P, L y E respectivamente. Estos receptores fueron identificados por investigadores que estudiaban los cambios que la activación celular causaba en la superficie de las plaquetas (selectina-P o CD62P), los leucocitos (selectina-L o CD62L) y las células endoteliales (selectina-E, ELAM-1 o CD62E). Los miembros de esta familia de receptores se expresan de forma diferencial según las diferentes estirpes celulares. La selectina-P está constitutivamente presente en gránulos intracelulares de las plaquetas (gránulos α) y de las células endoteliales.

les (cuerpos de Weibel-Palade) y solo se expresa en la superficie celular tras la acción de estímulos específicos [39]. La expresión de la selectina-E se restringe a las células del endotelio y se expresa, con una vida media corta, unas pocas horas [40], en su superficie después de la acción de ciertas citoquinas [41]. Las selectinas-E y -P regulan la interacción inicial de los neutrófilos, monocitos y algunas subpoblaciones de linfocitos con el endotelio [37]. La selectina-L está presente de forma constitutiva en la mayoría de los leucocitos [42] liberándose rápidamente de la superficie celular tras la activación leucocitaria tanto *in vitro* [43] como *in vivo* [44]. La selectina-L está implicada en la adhesión inicial de neutrófilos con las células endoteliales.

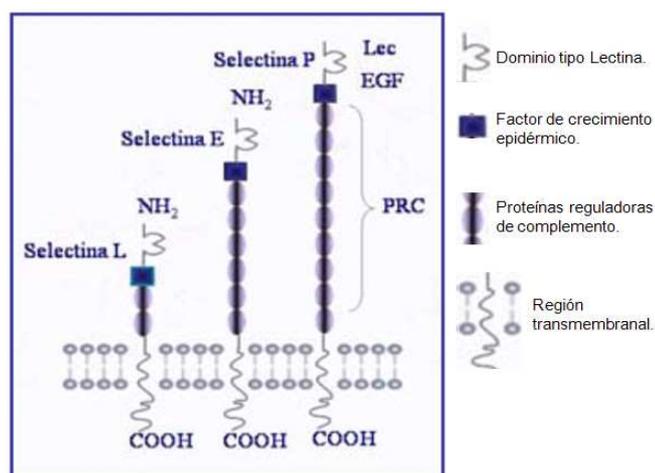


Figura 6. Estructura de las selectinas.

Cada una de las selectinas conocidas es una proteína transmembrana constituida por la repetición de tres tipos de dominios; un número variable de dominios tipo proteína reguladora del complemento, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico y un dominio tipo lectina [45] (ver Figura 6). El dominio tipo lectina (capaz de unir azúcares) es una estructura de interés especial ya que los carbohidratos juegan un papel importante como ligandos de la familia de las selectinas. De hecho, todas las selectinas reconocen carbohidratos sialilados estrechamente relacionados con el tetrasacárido Sialyl-Lewis^X y con su isómero Sialyl-Lewis^a [46]. Estos determinantes glucosilados están presentes en moléculas de superficie tipo mucina, que se expresan tanto en las células endoteliales como en los leucocitos. Hasta hoy se conocen cuatro moléculas tipo mucina que portan ligandos para los miembros de la familia de las selecti-

nas [47]: GlyCAM-1, CD34 y MadCAM-1 para la selectina-L y PSGL-1 para la selectina-P y -E. Además, se ha descrito una proteína (ESL-1) con homología al factor de crecimiento de fibroblastos que actúa como un ligando adicional para la selectina-E. La actividad funcional de las selectinas parece estar controlada principalmente por su presencia o ausencia de la superficie de las células. A este respecto, se han descrito formas circulantes en plasma de las tres selectinas conocidas y lo que resulta más interesante, que a concentraciones fisiológicas, estas formas solubles son capaces de bloquear la adhesión de los leucocitos al endotelio activado por citoquinas [48]. De estos datos se desprende que la función de las selectinas depende del balance entre las formas expresadas en la superficie celular, que favorecen la adhesión, y la concentración de las formas solubles, que la inhibe. Además de la liberación al medio [49], otros factores como la localización topográfica en la membrana celular y la relación con el citoesqueleto de actina juegan un papel en la adhesión entre selectinas y sus ligandos.

Tabla 3. Familia de moléculas de adhesión (**Selectinas**).

Moléculas de Adhesión	Localización	Expresión		Ligando	Función	Regulación
		Constitutiva	Inducible			
L-Selectina (CD62-L) (90-100 kD)	Todos los leucocitos en reposo.	Sí	No	Sialil-Lewis x Sialil-Lewis a selectina-P selectina-E GlyCAM-1 CD34 MAdCAM-1 PSGL-1 PCLP-1	Rodamiento de leucocitos. Interacción Leucocito-Endotelio. Tráfico y reticulación de linfocitos.	Aumenta rápidamente y es liberada mediante corte proteolítico después de la activación.
E-Selectina (CD62-E) (115 kD)	Células endoteliales activadas.	No	Sí	Sialil-Lewis x Sialil-Lewis a PSGL-1 ESL-1 selectina-L	Rodamiento de leucocitos.	Expresión aumentada por IL-1, TNF- α , IL-4, LPS.
P-selectina (CD62-P) (140 kD)	Endotelio activado (gránulos de Weibel-Palade) Plaquetas activadas (gránulos α)	Sí	Sí	Sialil-Lewis x Sialil-Lewis a Monosacáridos y Polisacáridos fosforilados. selectina-L PSGL-1	Rodamiento leucocitario temprano. Interacción entre plaquetas activadas y leucocitos. Tráfico de linfocitos B en placas de Peyer.	Expresión aumentada por trombina, histamina, LPS, ROIs.

4.3 La familia de las Integrinas

Las integrinas forman la familia de receptores de adhesión con una distribución más amplia y más numerosa. Prácticamente todas las células eucariotas expresan algún miembro de esta familia de receptores. Las integrinas median tanto las interacciones adhesivas de células entre sí como de estas con proteínas de la matriz extracelular. Del estudio de las deficiencias en la expresión de integrinas se ha establecido su papel esencial en procesos tan importantes como la respuesta inflamatoria [50], la hemostasia [51] y en el desarrollo embrionario [52]. Además, las integrinas juegan un papel central en la integridad del endotelio [16].



Figura 7. Estructura de las Integrinas.

Las integrinas contienen dos subunidades, α y β (**Figura 7**), que se unen por enlaces no covalentes. Cada subunidad es una proteína transmembrana producto de un gen independiente. Las regiones extracelulares participan coordinadamente en la unión del ligando y se unen a un segmento transmembrana que conecta con una región citoplasmática que interacciona físicamente con proteínas del citoesqueleto celular. De esta forma, las integrinas constituyen un puente de unión entre el medio extracelular y el esqueleto de la célula (**Figura 7**). Las integrinas no sólo median fenómenos de adhesión celular sino que también están implicadas directamente en la modulación del crecimiento celular [53] y en el control de la expresión de genes específicos. La familia de las

hasta cinco ligandos diferentes [56]. Recíprocamente, ciertos ligandos parecen ser sólo reconocidos por un número limitado de integrinas como ICAM-2 o C3bi, mientras que otros, como la fibronectina, son reconocidos por una gran diversidad de integrinas (**ver figura 8**). Muchos de los ligandos de las integrinas son componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, la fibronectina o la laminina. Sin embargo, varias integrinas reconocen proteínas presentes en la superficie de otras células, específicamente a miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como VCAM-1 e ICAM-1,-2,-3 [32, 34, 57]. Además, algunas integrinas pueden reconocer tanto proteínas de matriz como receptores de superficie; por ejemplo, las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$ reconocen tanto fibronectina como VCAM-1 [58].

Tabla 4. Familia de moléculas de adhesión (**Integrinas**).

Moléculas de Adhesión	Localización	Expresión		Ligando	Función	Regulación
		Constitutiva	Inducible			
$\alpha L\beta 2$ (CD11a/CD18, LFA-1)	Todos los leucocitos. Timocitos.	Sí	No	ICAM-1 ICAM-2 ICAM-3	Adhesión Migración	Expresión constitutiva.
$\alpha M\beta 2$ (CD11b, MAC-1)	Granulocitos Monocitos	Sí	Sí	ICAM-1 Factor X	Adhesión Migración	Expresión aumentada por IL-1, TNF- α .
$\alpha X\beta 2$ (CD11c/CD18)	Granulocitos Monocitos	Sí	Sí	Fibrinógeno IC3b	Activación Adhesión	Expresión aumentada por IL-1, TNF- α .
$\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, CD49d /CD29)	Linfocitos Monocitos Granulocitos activados.	Sí	Sí	VCAM-1 Fibronectina	Adhesión	Expresión aumentada por IL-1, TNF- α .
$\alpha 4\beta 7$ (LPAM-2)	Linfocitos	Sí	No	MAdCAM-1 VCAM-1 Fibronectina	Rolling Adhesión	Expresión constitutiva.

Cada estirpe celular tiene un repertorio característico de integrinas el cual puede variar dependiendo del estado de maduración celular [59], de la respuesta a la acción de citoquinas [60] o por transformación neoplásica [61]. El cambio en el repertorio de las integrinas constituye un elemento regulador importante para la capacidad adherente de las células. Algunas integrinas son exclusivas de un tipo celular determinado. Así, por ejemplo, las integrinas $\beta 2$ son específicas de los leucocitos y la integrina $\alpha 11b$ solo se encuentra en pla-

quetas y en sus progenitores, los megacariocitos [62]. Por el contrario, otras integrinas tienen una amplia distribución como las integrinas $\beta 1$ que están presentes prácticamente en todos los tipos celulares.

4.4 La familia de las Cadherinas.

4.4.1 Características y función de las cadherina.

Las cadherina son glicoproteínas transmembrana, constituidas por una sola cadena de dominios de cadherina (**Figura 9**). Sus uniones entre las células pueden ser homofílicas (cadherina iguales) o heterofílicas (diferentes cadherina) [63]. Esta función es dependiente de temperatura y calcio [64, 65].

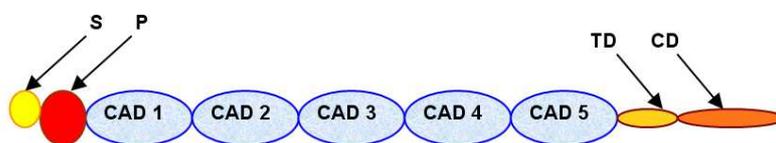


Figura 9: Esquema de la disposición intercelular de las Cadherina.

S: péptido para la localización celular de membrana, **P:** propéptido clivable, **CAD1- 5:** dominios cadherina, **TD:** dominio de transmembrana, **CD:** dominio citoplasmático conservado.

Las cadherinas se clasifican en clásicas y desmosomales, las más conocidas dentro del grupo de clásicas son: E-epitelio, N-neural, P-placentaria, R-retina, B-cerebro y VE-vena endotelial. Las desmosomales son las desmogleínas y democolinas. Podemos encontrar más de un tipo de cadherina en un mismo tipo celular [63, 64, 66].

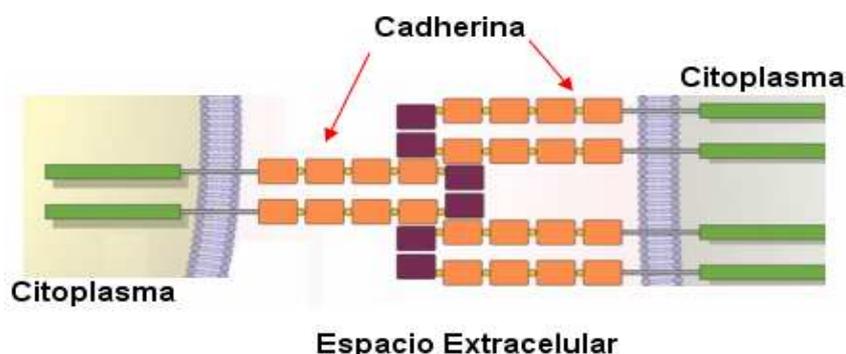


Figura 10: Localización de las cadherina.

Algunos autores plantean que la adhesión de los PMN a las CE desencadena una serie de acciones que tienen como consecuencia la disociación de las VE-

Cadherinas. Este proceso facilita el paso de los PMN a través de las uniones paralelas entre las células endoteliales [63, 64].

Las VE-Cadherinas son de vital importancia para el mantenimiento y control de los contactos entre las células endoteliales. Regulan mecanismos como la permeabilidad vascular y extravasación leucocitaria. Sus funciones están repartidas entre el establecimiento de uniones laterales entre células (**Figura 10**) y la morfogénesis y desarrollo de los epitelios [67]. Además, es importante señalar su función en el desarrollo y crecimiento embrionario, así como la implantación de los blastómeros. Además de sus funciones adhesivas, las VE-Cadherinas regulan diversos procesos celulares como, la proliferación, apoptosis y angiogénesis. Ratones deficientes de VE-Cadherina murieron a mitad de periodo gestacional por malformaciones vasculares [68]. Ha sido aceptado por muchos años la vinculación entre cadherina y el citoesqueleto de actina a través de Cateninas, mecanismo que favorece la adhesión entre las células endoteliales [64].

4.5. La familia de las Mucinas.

La familia de las mucinas posee una estructura extendida y muy glicosilada en residuos de serina y treonina (**Figura 11**). Intervienen en la formación de epitelio y parecen modular las interacciones de adhesión y antiadhesión.

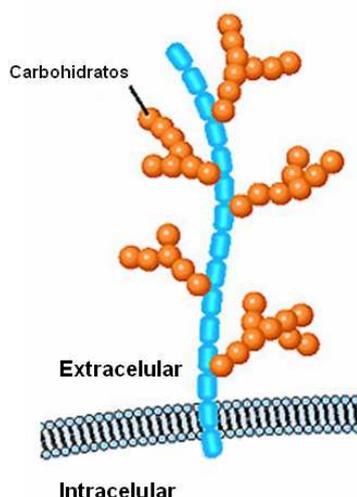


Figura 11. Estructura de las mucinas.

Dentro del grupo de las mucinas encontramos moléculas que participan en interacción con la familia de las selectinas, ellas son: GlyCAM-1 (*Glycosylated-*

dependent Cell Adhesion Molecule-1), CD34, MadCAM-1 (*Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1*) y PSGL-1.

El **GlyCAM-1** se expresa en las células endoteliales cuboidales de las vénulas, en los ganglios linfáticos. No posee una región transmembranal y una proporción significativa de la misma puede que sea secretada al medio extracelular. El **CD34** se encuentra en células hematopoyéticas inmaduras y células endoteliales. Su presencia no está restringida al endotelio, por lo que podemos encontrarla tanto en las células planas como en las cuboidales de diversos tejidos y órganos. Es un antígeno de diferenciación leucocitaria y su función de ligando depende de su glicosilación y grado de sulfatación. La molécula **PSGL-1** se detecta principalmente en granulocitos y otras células mieloides; corresponde a una molécula homodimérica transmembrana que interacciona con afinidad con la selectina-P. La molécula **MadCAM-1** posee una región tipo mucina y tres dominios tipo inmunoglobulina, por lo que puede ser considerada como miembro de la superfamilia de las Inmunoglobulina. Se expresa en el endotelio cuboidal de los vasos sanguíneos de las placas de Peyer en el intestino delgado, y una variante de la misma se detecta en las células endoteliales de los ganglios linfáticos mesentéricos.

Se han identificado otras mucinas como ligandos de selectinas, entre los que se encuentra la molécula CLA (*Cutaneous Lymphocyte Antigen*) expresada en una subpoblación de linfocitos. Los carbohidratos que posee, que son semejantes a la forma sializada de Lex, son identificados con el anticuerpo HECA-452. Dicha molécula interacciona con la selectina-E y se detecta en forma preferencial en algunos linfocitos T de memoria inmunológica, que por su función específica podrían jugar un papel importante en la evolución de una inflamación desde aguda a crónica [35, 69].

5. Eventos tardíos del proceso inflamatorio (fagocitosis y degranulación).

La fagocitosis es un proceso activo que requiere consumo de energía. Al acercarse el PMN a la partícula que va a fagocitar, primero se une a ella y después proyecta pseudópodos en todas las direcciones para envolverla. Estos pseudópodos se encuentran unos con otros en el otro extremo y se funden, creando una cámara cerrada que contiene la partícula fagocitada. Luego

la cámara se invagina hacia el citoplasma y se separa de la membrana celular externa, conservando un fragmento membranoso que la envuelve y aísla del citosol, formándose así una vesícula fagocítica (también llamada fagosoma) que flota libremente en el citoplasma [70] **Figura 12.**

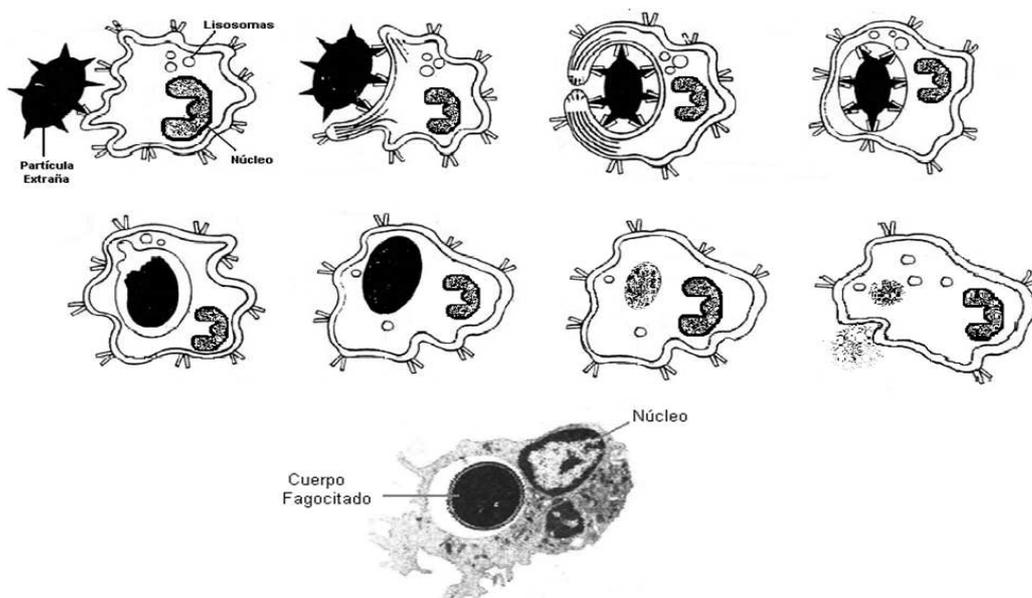


Figura 12. Proceso de fagocitosis y degranulación.

La degranulación generalmente ocurre luego del proceso de fagocitosis, pero puede suceder en ausencia del mismo. Transcurre una vez los PMN son estimulados y se funde el fagosoma con los gránulos lisosomales, formándose el fagolisosoma, el cual contiene enzimas y proteínas antimicrobianas, para finalmente verter el contenido en el espacio extracelular (exocitosis). Además de la degranulación, los estímulos que activan a los PMN producen la liberación de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y la generación de radicales libres de oxígeno que contribuyen a la destrucción de los tejidos [24].

6. Cascada inflamatoria. Cambios hemodinámicos y activación endotelial.

Independientemente del agente etiológico que ocasiona la respuesta inflamatoria, este proceso es exclusivo de los tejidos vascularizados. Las células endoteliales son la primera diana de cualquier cambio que ocurre en la circula-

ción por encontrarse en la interfase entre la sangre y los tejidos.

Los signos locales de la inflamación aguda provienen de la modificación del tejido afectado a nivel del lecho microvascular. Se puede apreciar la dilatación capilar con sus manifestaciones de calor y rubor características, producto de los mediadores inflamatorios. Como consecuencia, se produce un aumento de la permeabilidad vascular y la salida de plasma hacia los espacios extravasculares, originándose el tumor y el consecuente dolor. Hasta mediados del siglo pasado se pensaba que el endotelio tenía una función pasiva [71]. No fue hasta 1966 que Cliff planteó la hipótesis del papel activo del endotelio en el proceso migratorio de los leucocitos. Hoy día se conoce que es el propio endotelio estimulado quien tutela la migración organizada hacia el foco inflamatorio, regulado por las moléculas de adhesión expresadas en ambos tipos celulares [17, 72, 73]. Este proceso ha sido estudiado detalladamente utilizando modelos *in vivo* mediante técnicas de microscopía intravital [9].

La interacción secuencial leucocito-célula endotelial ha sido descrita por varios autores. Unos las dividen en tres etapas, rodamiento, adhesión y extravasación o diapédesis [17, 18]. Otros autores son más extensos y las clasifican en cinco, contactos aleatorios, rodamiento, adhesión, diapédesis y quimiotaxis [74].

Desde el punto de vista molecular y mecanístico se han descrito nuevos pasos en la cascada de adhesión, como son, enlentecimiento del rodamiento, locomoción intraluminal o la ruta alternativa de migración transcelular [75, 76].

6.1 Rodamiento y activación de leucocitos.

Los leucocitos se mueven siguiendo líneas de flujo sanguíneo. Durante su tránsito, se producen contactos esporádicos pero continuados con las paredes de los vasos; de tal manera, se puede decir que las paredes están siendo exploradas perennemente por las células circulantes. No obstante, sin la mediación de estímulos extravasculares esos contactos eventuales entre los leucocitos y el endotelio no implican migración. Sólo cuando se produce una lesión las células endoteliales de los vasos cercanos se activan por la acción de estímulos, como las citoquinas y aminas vasoactivas, las cuales, a su vez, han sido liberadas en células próximas al daño tisular e inducen la expresión de moléculas

las específicas de superficie (**Figura 13**).

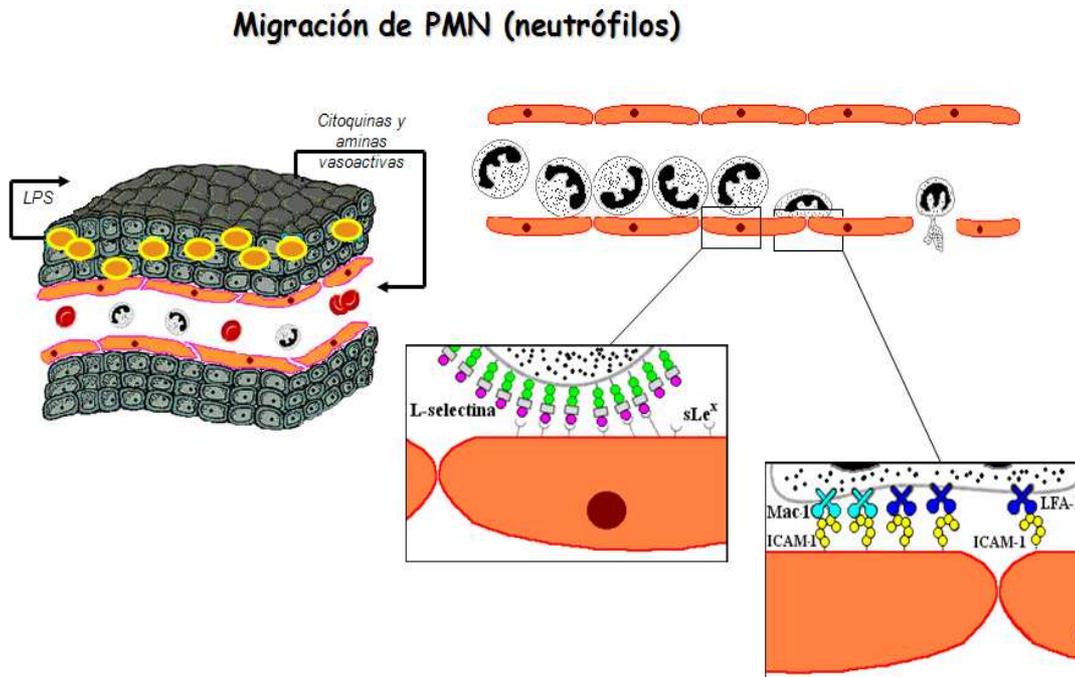


Figura 13. Migración de los PMN al foco inflamatorio.

Estas moléculas son reconocidas por la selectina-L que se encuentra expresada constitutivamente en la mayoría de los leucocitos y que se unirá a sus respectivos ligandos en el endotelio, como la mucina PSGL-1. La actividad de las selectinas es crucial porque determina la velocidad de circulación del leucocito, siendo la selectina-L la que media el rodamiento rápido, la selectina-E el más lento [77, 78], y se plantea que la selectina-P ocupa rangos intermedios entre ambas. En esta parte del proceso se frena a los leucocitos, que comienzan un rodamiento más lento a lo largo de la superficie del endotelio [79].

6.2 Adhesión firme al endotelio.

La activación de la molécula Mac-1 (CD11b) permite una adhesión más fuerte y estable del PMN a las CE a través de la unión de su ligando, ICAM-1. Además, se activan integrinas como la β_2 y aumenta la afinidad por los ligandos [80].

6.3 Extravasación o diapédesis hacia el foco de la lesión.

Es la etapa final de la cadena, en la que los leucocitos adheridos firmemente se abren paso entre las células del endotelio. Es posible gracias a la unión firme y definitiva de moléculas como LFA-1/ICAM-1 [81]. Una vez rebasada la barrera endotelial, los PMN se dirigen al foco de la lesión debido a estímulos quimiotácticos. Tal desplazamiento lo realizan mediante movimientos ameboides que ejecutan a diferentes velocidades, de hasta 40 $\mu\text{m}/\text{min}$, para finalmente cumplir su función de eliminar el agente lesivo infiltrado en los espacios intersticiales [82]. Moléculas como el CD31, CD99 y miembros de la familia *JAM* expresados a nivel de las uniones intercelulares endoteliales, han demostrado un papel funcional en esta parte final de la extravasación de leucocitos durante la respuesta inflamatoria [83, 84]. Para la extravasación final del leucocito, el ICAM-1 expresado por el endotelio, junto con el CD31 [85] y el CD99 [84], expresados tanto por el endotelio como por los leucocitos, parecen tener un papel esencial.

7. Receptores adrenérgicos. Características generales.

Los receptores adrenérgicos o adrenoceptores son una familia de proteínas que se expresan en la superficie de diversos tipos celulares y que reconocen a los neurotransmisores adrenérgicos (catecolaminas). Su estudio se remonta al año 1893 cuando Oliver y Schafer demostraron que extractos de glándula suprarrenal producían aumento de la presión arterial [86]. Sin embargo, los primeros intentos de clasificación farmacológica de los adrenoceptores en diferentes grupos (α y β), no se realizan hasta 1948 por Raymond P. Ahlquist [87, 88]. A partir de 1970 y durante las dos décadas siguientes, se hacen contribuciones en este campo, dándose a conocer una clasificación detallada de los adrenoceptores que se representa en la **Figura 14** [87-89].

Existen dos grandes tipos de receptores adrenérgicos los α y los β . Los receptores α se subclasifican en $\alpha 1$ ($\alpha 1_A$, $\alpha 1_B$ y $\alpha 1_D$) y $\alpha 2$ ($\alpha 2_A$, $\alpha 2_B$ y $\alpha 2_C$), [90-92]. Se ha descrito que la estimulación de receptores $\alpha 1$ incrementa la producción de IL-6, así como el número de linfocitos B y T en el bazo [93]. Respecto a los receptores $\alpha 2$, los subtipos $\alpha 2_A$ y $\alpha 2_B$ participan en el control de la contracción arterial, y $\alpha 2_C$ es el responsable de la contracción venosa [90]. Estu-

dios realizados en ratones con deficiencia genética muestran que la ausencia de las tres subunidades de α_2 no es compatible con la vida. Los embriones que carecen de estos receptores α_2 , mueren a mitad de la gestación al ser esenciales para el desarrollo del sistema vascular de la placenta durante el desarrollo prenatal [92, 94, 95].

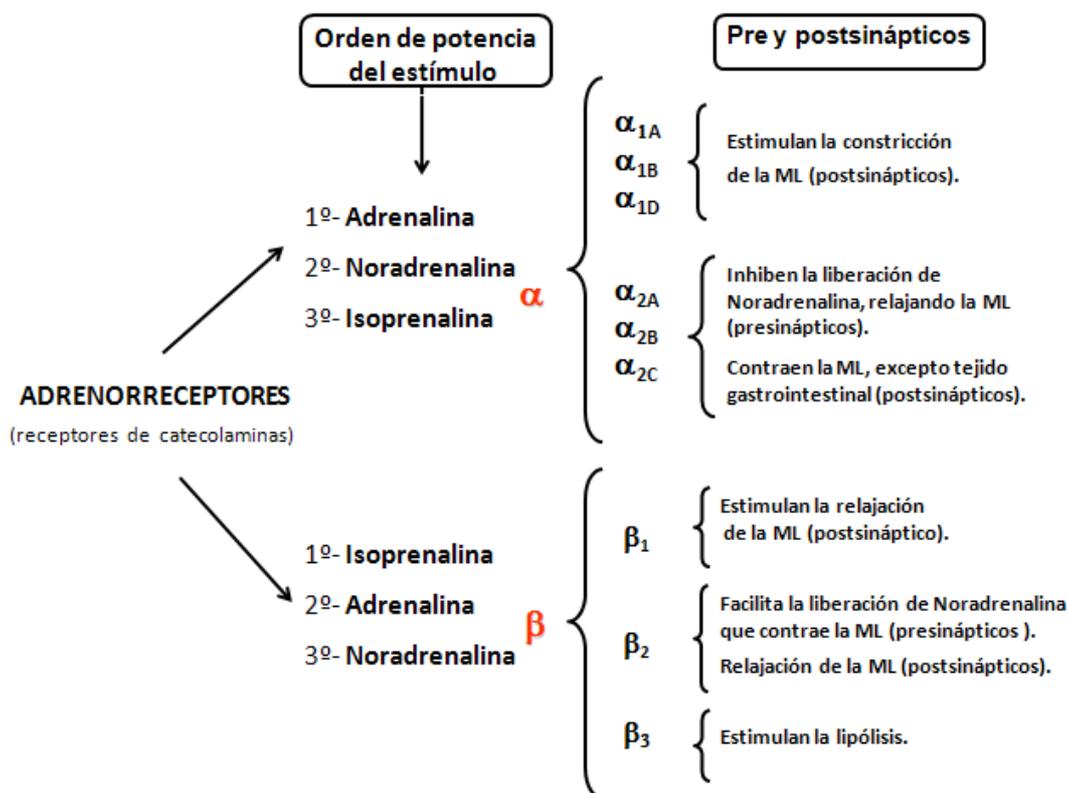


Figura 14. Clasificación de los adrenoceptores.

Dentro de los β adrenérgicos existen tres tipos, los β_1 , β_2 y β_3 con función inhibitoria (vasodilatación, relajación de la musculatura urinaria, broncodilatación), además de una importante función excitatoria a nivel cardiaco [87]. Principalmente se expresan en PMN, basófilos, eosinófilos y timocitos [93, 96].

El tamaño de los receptores adrenérgicos es de 64 a 68 kD. Forman cadenas de 402-525 aa que se inician en la parte extracelular y pasan a través de la membrana, conformando una secuencia zigzagueante de siete segmentos hidrofóbicos que terminan finalmente en la región intracelular. En los segmentos transmembrana se localizan los sitios de unión para los ligandos [97] **Figura 15.**

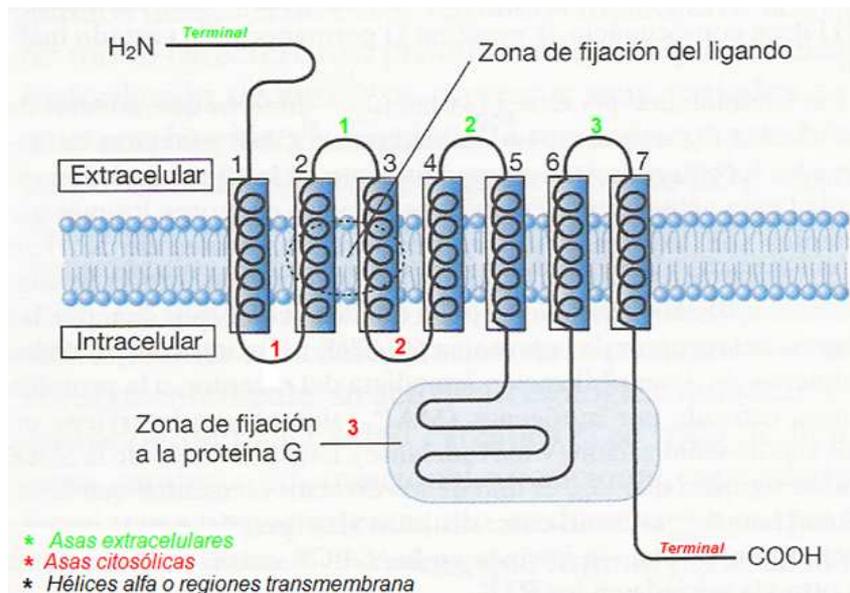


Figura 15. Segmentos transmembrana.

Los receptores adrenérgicos α_2 pertenecen a la superfamilia de receptores que se acoplan a proteínas G, generalmente G_i, inhibitoras [91, 97-104]. Estos receptores α_2 inhiben la adenilatociclasa y, como consecuencia, disminuyen la formación de AMPc [101] (Figura 16). Sin embargo, se ha mostrado que el uso de UK 14304, un agonista sintético adrenérgico α_2 aumenta el AMPc en PMN de rata [105].

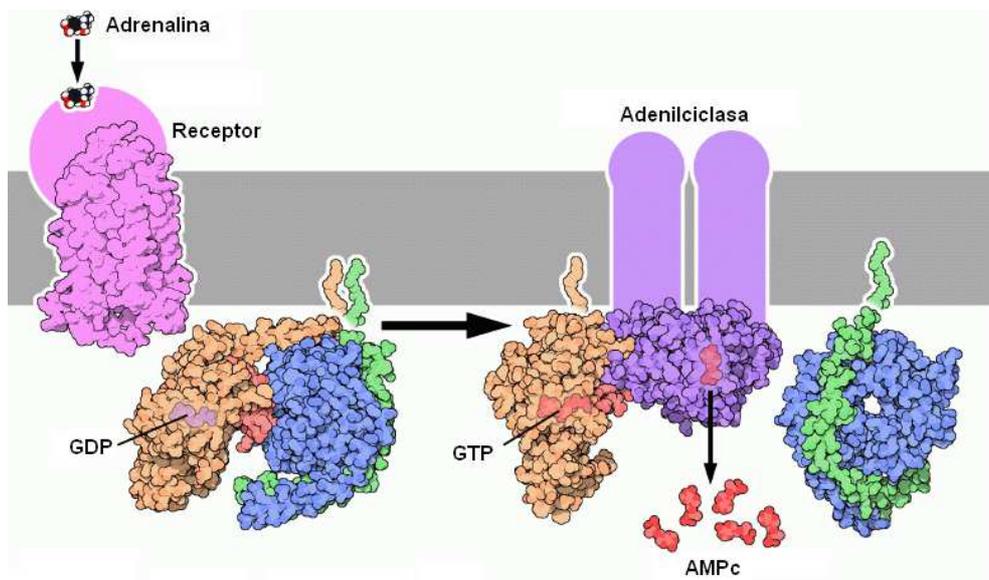


Figura 16. La adrenalina se une a su receptor, este se asocia a una proteína G heterotrimérica. Luego se une a la adenilato ciclasa la cual convierte ATP en AMPc iniciando una transducción de señales intracelulares.

puesta será según el receptor que tengan en mayor proporción, además, pueden desacoplarse de las proteínas G si el tiempo de exposición frente a los agonistas es prolongado [100]. Se ha comprobado que la cantidad de receptores en las células no está asociado a hábitos como el tabaco, alcohol, café, ni tampoco la edad o el sexo [96].

Debido a la importancia que tienen los agonistas α_2 en los últimos años se han llevado a cabo muchos trabajos de investigación, algunos de ellos relacionados con el control de la presión arterial [97, 104, 113], y la presión intraocular [95]. Además, se ha estudiado el efecto que tienen los agonistas adrenérgicos α_2 sobre diferentes grupos celulares; habiéndose comprobado que el proceso de diferenciación de las células hematopoyéticas está mediado por receptores α_1 y, en menor medida, por α_2 [93].

Se ha sugerido que las tres subunidades de adrenoceptores α_2 están involucradas en la regulación de la percepción del dolor en ratones [95] y no tienen ningún efecto en procesos como la quimiotaxis, fagocitosis o la liberación de superóxido en PMN humanos [109]. Se han realizado estudios con agonistas adrenérgicos α_2 en procesos como la apoptosis de células mesenquimales [114], la vasodilatación y vasoconstricción en células endoteliales porcinas y de ratón. En ambos estudios se empleó el UK 14.304 como agonista adrenérgico α_2 [115-117]. También se ha descrito el uso de agonistas adrenérgicos α_2 en células HUVEC para el estudio de la angiogénesis [107], la hipertensión, el feocromocitoma (tumor de la glándula suprarrenal), así como bajo otras condiciones fisiopatológicas [118]. Otras investigaciones en las que se han empleado ratones y fármacos agonista adrenérgicos α_2 (UK 14.304) y antagonista (RX 821002), han demostrado la acumulación de PMN en pulmón [119] así como en células dendríticas de cerebro [120] y el análisis dosis dependiente del nivel de glucosa en sangre [121]. Otro agonista adrenérgico α_2 , la Dexmedetomidina, tiene acción inhibitoria de la hiperalgesia térmica en ratas con monoartritis [122]. La Clonidina (agonista adrenérgico α_2), es un fármaco antihipertensivo central efectivo para prevenir el déficit de memoria y la atención visual en ratas [123]. Además, se plantea que el uso de antagonistas α_2 , por su capacidad de aumentar la actividad noradrenérgica, podría tener beneficios

terapéuticos para el tratamiento de la fibromialgia y el síndrome de fatiga crónica [93]. Otros usos terapéuticos de estos agonistas $\alpha 2$ son: analgésico [124], antipirético [90, 125], depresión, ansiedad y obesidad [97], así como procesos migrañosos [126].

7.3 Los receptores adrenérgicos en la respuesta inflamatoria.

Todos los procesos que incluyen respuestas inflamatorias tienen en común una alteración de la regulación del sistema inmune y de las vías del stress [127, 128]. Dos vías del stress, el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y el sistema nervioso simpático regulan la respuesta inmune a través de la liberación de glucocorticoides y noradrenalina (norepinefrina), respectivamente. La noradrenalina reconoce receptores de membrana (α y $\beta 1$ adrenérgicos) expresados por las células implicadas en la respuesta inflamatoria [129].

Las células endoteliales responden a la estimulación con agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ aumentando la producción de óxido nítrico, molécula que atenúa la interacción del PMN con el endotelio vascular [130]. Este efecto no es exclusivo de los receptores α de las células endoteliales, ya que también estas células responden a estímulos con β adrenérgicos *in vitro* con iguales resultados [131]. Los receptores $\alpha 2$, pero no los $\alpha 1$, inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias en modelos animales de inflamación pulmonar [119].

Existen otras referencias que aluden a la relación de los agonistas adrenérgicos con la respuesta inflamatoria. El asma bronquial es una de las enfermedades inflamatorias en las que se ha demostrado que la combinación de esteroides y agonistas $\beta 2$ locales, es clínicamente más efectiva que cada uno de ellos por separado [96, 132]. Los agonistas adrenérgico $\beta 2$ combinados con corticoesteroides tiene efecto antiobstructivo de las vías respiratorias [133]. Lo anterior parece deberse al incremento y estabilización de la señalización por AMPc que producen los esteroides [134].

Las catecolaminas son consideradas potentes estimuladores de citoquinas proinflamatorias [135]. La cooperatividad entre la producción de cortisol y norepinefrina produce citoquinas proinflamatorias en tejido sinovial. [133]. El con-

trol de la producción de citoquinas proinflamatorias y la agregación plaquetaria como resultado de la estimulación de PMN humanos por adrenoceptores $\alpha 2$, es de vital importancia en pacientes en estado crítico que cursan con trombosis y procesos inflamatorios [136]. En ratas adrenalectomizadas el uso de corticosteroides incrementa la COX-1 gástrica mediante estímulo de receptores $\alpha 2$, y disminuye la COX-2 por estímulo de receptores $\beta 2$ [137].

La pérdida de funcionalidad de los adrenoceptores se ha relacionado en varias ocasiones con la muerte celular, al menos se ha comprobado que el uso de agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ acelera la apoptosis en PMN humanos [110], así como en células mesenquimales de ratón [114].

8. Modelos animales de inflamación.

Humanos y animales hemos estado muy entrelazados desde el comienzo de la civilización. Al principio los segundos eran sólo fuente de alimento, posteriormente los que se podían domesticar pasaban a ser animales de compañía. Debido a la estrecha relación que durante años se ha establecido con los animales, es coherente que desarrollemos sentimientos encontrados sobre usarlos en la investigación biomédica.

El uso de animales para la investigación se remonta al antiguo Egipto y Grecia. Con más repercusión mediática tenemos los experimentos llevados a cabo por Louis Pasteur empleando perros para el estudio de la rabia, así como los llevados a cabo por Robert Koch a finales del siglo XIX, en los que inyectó sangre de vacas infectadas por ántrax a ratones que posteriormente desarrollaron la enfermedad. Los animales empleados para desarrollar un modelo en investigación se seleccionan sólo si comparten características con los humanos, así como si existe una justificación real de ser la única vía para conocer la fisiopatología de la enfermedad [138].

El hombre es vulnerable a múltiples enfermedades y susceptible a ser afectado por los mismos parásitos, virus y bacterias que infectan a los animales. Compartimos 65 tipos de enfermedades infecciosas con los perros, 50 con el ganado, 46 con las ovejas y cabras, 42 con los cerdos, 35 con los caballos y 26 con las aves de corral, además, desarrollamos de manera muy similar en-

fermedades como la epilepsia, hemofilia y diabetes. Todo ello hace que el uso de animales en la investigación facilite información de cómo se desarrollan diversas enfermedades en humanos [138] es decir, cómo las patologías se producen, evolucionan, los rasgos de su fisiopatología y, sobre todo, cómo pueden ser tratadas.

Primero se intenta reproducir en el animal la enfermedad objeto de estudio, de forma que se manifieste de manera similar a como lo hace en el hombre, lo cual constituye una ventaja fundamental frente a los modelos *in vitro*. Por otra parte, en los modelos animales se aplican técnicas de análisis que no serían posibles en la especie humana por razones éticas [139]. Por último, la aplicación de posibles medidas terapéuticas para aliviar o curar la enfermedad permite calibrar su eficacia, o sus peligros, antes de probarlas en la especie humana.

8.1 Modelos animales de inflamación aguda.

Los modelos animales de inflamación permiten recrear *in vivo* cómo ocurre el proceso inflamatorio que se pretende estudiar, siendo el modelo de *Air Pouch* [140-142] y la *Peritonitis por Tioglicolato* [143, 144] algunos de los menos agresivos con el animal.

Existen otros modelos de inflamación para estudiar la cascada de adhesión, entre ellos encontramos el estudio de la lesión pulmonar aguda [145], inducción de inflamación por carragenina en zona plantar de ratas [146], colitis inducida por dextrano y ácido acético e ileítis crónica [73, 147]. Además se han realizado estudios donde se relacionan las enfermedades reumáticas con lesiones intestinales [148]. Induciendo inflamación con carragenina en articulaciones de ratones, se ha estudiado el efecto antiinflamatorio de diversos productos, como el GCSB-5 compuesto por 6 hierbas de origen oriental [149]. Además, la estimulación del nervio vago inhibe la respuesta inflamatoria en modelos de artritis murina inducida por carragenina [128].

Para contribuir al desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento del asma bronquial, se han empleado desde hace más de 100 años los conejillos de india como modelo animal [139, 150]. En este trabajo se emplearon ratones de cepa CD1 (Swiss) **Figura 18**.



Figura 18: Ratones de cepa CD-1 (Swiss).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo: Los agonistas adrenérgicos α_2 interfieren en algunas de las fases de la cascada de adhesión, inhibiendo la capacidad de los leucocitos de acumularse en los focos inflamatorios.

Objetivos:

- 1) Estudiar la presencia de los subtipos de receptores adrenérgicos α_2 en neutrófilos humanos y HUVEC, así como conocer su capacidad funcional.
- 2) Determinar el efecto de la estimulación de receptores adrenérgicos α_2 sobre la respuesta inflamatoria mediante modelos animales.
- 3) Estudiar *in vitro*, el efecto de la estimulación de receptores adrenérgicos α_2 sobre los mecanismos que intervienen en las diferentes fases de la respuesta inflamatoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS:

1. Células primarias:

1.1 Células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC).

Los cordones umbilicales fueron donados por el Servicio de Ginecología del Hospital Universitario de Canarias previo consentimiento de los donantes.

Las células endoteliales se extrajeron por disgregación enzimática de la pared de la vena de los cordones umbilicales (**ver Figura 1**), y se cultivaron como una monocapa adherente, característica de las HUVEC.

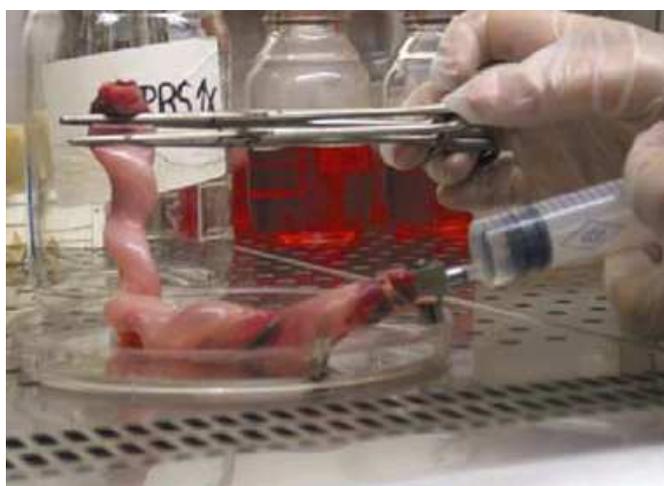


Figura 1: Proceso de extracción de HUVEC.

Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente su número a lo largo de 4-5 pases viables.

Las HUVEC se obtuvieron a partir de cordones donados mantenidos a 4°C hasta 24h después del parto, y se consideraron viables hasta el séptimo día. En primer lugar, se limpian externamente con suero fisiológico y gasas para eliminar la sangre externa que puedan contener. Posteriormente, se procede al canulado de la vena principal con una aguja roma (Hamilton) que se fija con una pinza (Hoffman). A continuación se conecta la aguja con una llave de 3 pasos (B. Braun Melsungen AG) en posición cerrada y se coloca la abrazadera (Extrudan) en posición abierta en el extremo del cordón que no está canulado. A la llave de 3 pasos se conectó una jeringa (BD Perfusion) con suero fisiológico (B. Braun Medical S.A) para lavar la vena y así eliminar restos de sangre. Seguidamente, se infundió 0,5 mg/ml de Colagenasa P (1ml/min) y se incubaron en una estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO₂ durante 20 min. Pasado el

periodo de incubación se realizó un corte con un bisturí estéril y se extrajo el contenido con las células en suspensión en tubos de 50 ml. A continuación, se centrifugó la suspensión celular el tubo a 1200 rpm durante 10 min y se resuspendió en 5-7 ml de medio 199 con 10% de suero sin factores. Estas células se siembran en un T25, sin sustrato (gelatina) y se incuban durante 24 h. Posteriormente, se lavó el frasco con PBS 1× o HBSS estéril 2-3 veces para eliminar restos de hematíes y se añadió medio de cultivo nuevo. Aproximadamente en 72h. alcanzan la confluencia y se pueden pasar a un T75 (preincubado con gelatina 0,5 % (Sigma) en suero fisiológico a 37°C durante 1h) en medio 199 (PAA) + 20% de suero (PAA) +1% de HEPES (PAA) +1% de Penicilina/Streptomycin (PAA).+ 50µg/ml de ECGF (BD Bioscience) + 5% de heparina (Chiesi, España S.A).

1.2 Células polimorfonucleares (PMN) humanas y murinas.

Los neutrófilos humanos se obtuvieron de sangre periférica de donantes sanos, previo consentimiento, en el Laboratorio Central del Hospital Universitario de Canarias.

La separación celular se realizó por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll (Biochrom AG, Berlin) a 1800 r.p.m durante 30 min. Luego se realizó una sedimentación a 1G en dextrano 1.3% (Sigma Chemical Co) durante 20 min a temperatura ambiente. La fracción en la que se encuentran los neutrófilos se centrifugó a 1200 rpm y posteriormente se realizó un choque osmótico para eliminar los eritrocitos, dando una pureza mayor al 95% (positivos en citometría de flujo para CD11b).

Para el aislamiento de PMN murinos, se emplearon ratones de cepa CD-1. Se extrajo aproximadamente 1ml de sangre por vía intracardiaca, y se aislaron aproximadamente 2×10^6 de PMN, siguiendo el mismo procedimiento que se describió para los PMN humanos.

2. Reactivos químicos.

2.1 Anticuerpos.

Para el marcaje de moléculas de superficie de las células que se analizaron por citometría de flujo se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales:

- I. Las Inmunoglobulinas (IgG1) de sobrenadantes monoclonales, procedentes del Laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario de La Princesa. Se utilizaron: anticuerpo anti-CD11b (clon bear-1), anticuerpo anti-CD45 (clon D3/5) y como control negativo P3X63 [151].
- II. El clon Leu-8 (Anticuerpo monoclonal anti-selectina-L) se obtuvo en Becton Dickinson (Mountain View, CA).
- III. Como anticuerpo secundario se utilizó la inmunoglobulina de conejo anti-ratón F(ab')₂ marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) de DakoCytomation (Dinamarca A/S).
- IV. EL clon-SK11, anti-selectina-L de ratón (CD62L/Mel-14), BD Pharmingen.
- V. La Inmunoglobulina (IgG_{2a}) monoclonal, Integrina α L clon-M17/4 rata-anti ratón. (Santa Cruz, Biotechnology).
- VI. La Inmunoglobulina (IgG2 α) Isotipo control de rata, clon R35-95 (BD Pharmingen).
- VII. Anti CD11b FITC antiratón, clon M1/70.15 (Immunotools).

2.2 Otros reactivos.

- I. Lipopolisacárido (LPS), 1 μ g/ml, Sigma-Aldrich.
- II. Factor de necrosis tumoral (TNF α), 20ng/ml, Immunotools.
- III. *Phorbol myristate acetate* (PMA), 20ng/ml, Sigma-Aldrich.
- IV. Dimetil sulfóxido (DMSO), 10%, Sigma-Aldrich.
- V. Fibronectina (Sigma-Aldrich).
- VI. BSA (Fluka).
- VII. IL-8 (Immunotools).

3. Experimento con agonistas y antagonista adrenérgicos α 2.

Para los experimentos con agonistas adrenérgicos α 2, se emplearon UK 14.304, Clonidina y Xilacina disueltos al 0,1% de DMSO en PBS. Como antagonista α 2 se empleó RX 821002, todos ellos obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co (**Figura 2**).

En los modelos *in vivo* las dosis empleadas de agonistas adrenérgicos α 2 fueron desde 0,5 a 16mg/Kg y del antagonista α 2, 5mg/Kg, ambos durante 4h, según protocolo. En los experimentos *in vitro* los neutrófilos se preincubaron con agonistas y antagonista adrenérgicos α 2 a concentraciones comprendidas entre 0,1 μ M y 100 μ M a 37°C durante 20 min. Las HUVEC fueron tratadas entre 6 y 12h a 37°C con 100 μ M de agonistas y antagonista α 2.

Finalmente, la dosis respuesta realizada con agonistas y antagonista α 2 permitió determinar que la dosis óptima de trabajo *in vitro* con PMN humanos, de ratón y HUVEC era de 100 μ M.

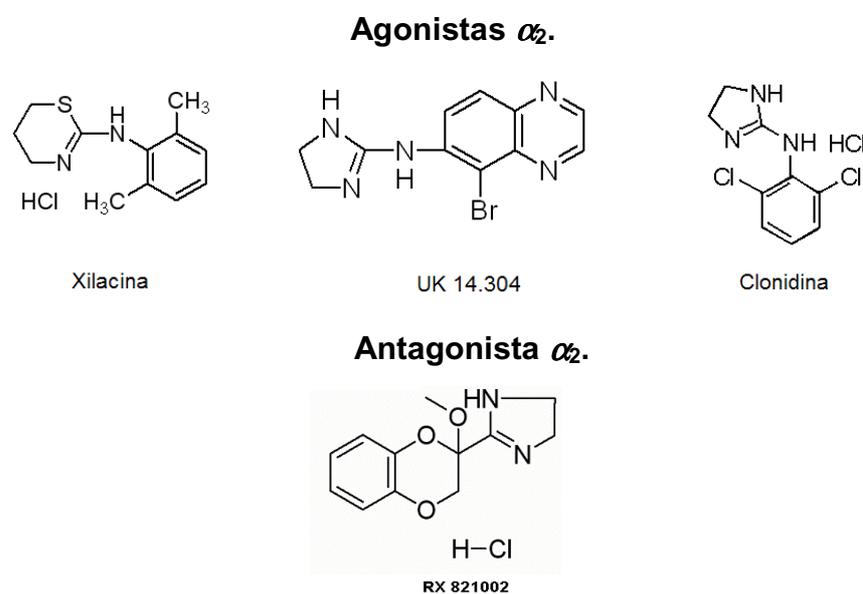


Figura 2: Estructura de los agonistas y antagonista α_2 empleados.

4. Modelos animales de inflamación aguda.

Los ratones empleados fueron de la cepa CD-1 (Swiss), machos (para evitar las fluctuaciones hormonales de las hembras), no consanguíneos, con un peso aproximado de 30g y de 5 a 6 semanas de edad (Laboratorio Jackson).

Para el estudio *in vivo* de la inflamación aguda se utilizaron los modelos animales de *Air Pouch* (bolsa de aire) y *Peritonitis por Tioglicolato*.

4.1 Modelo *Air Pouch* (Bolsa de Aire).

El fundamento de este modelo [140, 141, 152-154] (ver **Figura 3**) consiste en crear una cavidad de aire estéril en el dorso de los ratones. Esta cavidad puede usarse para estudiar la respuesta migratoria de PMN y otras células ante estímulos quimioatrayentes en la inflamación aguda. Utilizándose como control negativo de migración de neutrófilos (PBS 1x + EDTA 3mM) o quimioatrayente, que sería el control positivo. Para este modelo se empleó como quimioatrayente el Zymosán A (células de levadura).



Figura 3: Modelo de inflamación aguda *Air Pouch*.

4.1.1 Material para desarrollar el modelo *Air Pouch*.

Los materiales empleados para el desarrollo de esta técnica son los que se describen a continuación:

- Ratones machos, no consanguíneos, de cepa CD-1 (Swiss), peso 30g, 5-6 semanas de edad. (Laboratorio Jackson).
- Tampón PBS 1x + EDTA 3mM.
- Ketolar 50mg/ml (Ketamina). Uso: 85mg/Kg. (Pfizer)
- Rompun 2%, (Xilacina). Uso: 16mg/Kg (Bayer).
- Zymosán A. (Sigma). Uso: 1% (50mg/5ml PBS + EDTA 3mM)
- Jeringuillas de 0,5ml (BD Micro-Fine).
- Jeringuillas de 5 ml (BD Discardit).
- Agujas de 25G (BD Microlance).
- Filtros de 0,22 μ m (Millipore).
- Tubos de polipropileno (Falcon Labware, Oxnard, C.A).
- Fluorosferas (Beckman Coulter).
- Citómetro de flujo Epics XL (Coulter).

4.1.2 Método:

En primer lugar, los animales se colocaron en jaulas individuales para evitar agresiones entre ellos y contribuir así, a su buen estado físico. Estos se anes-

tesiaron con una combinación 85mg/Kg de Ketolar y 16mg/Kg Rompun. Posteriormente, se colocaron los ratones en posición horizontal y se les realizó una inyección subcutánea de 5 ml de aire estéril en la zona dorsal. Trascorridas 72h. se vuelven a anestesiarse los ratones y se procede a rellenar las bolsas dorsales con 3 ml de aire estéril. Al sexto día de iniciar el protocolo se realiza el tratamiento intramuscular (IM) con los diferentes productos y fármacos a estudiar. Éste se realizó aproximadamente 10 min antes de introducir en la cámara de aire el quimioatrayente a utilizar en este modelo, 1% Zymosán A en 50mg/5ml PBS + EDTA 3mM. Trascorridas 4h. (tiempo en el que el 90% de las células migradas deben ser neutrófilos) se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se procedió al lavado de la bolsa con 5 ml de tampón PBS 1× + EDTA 3mM. La extracción de la muestra (líquido de la bolsa), se realizó haciendo una única punción en la bolsa. Para ello es importante colocar el animal de lado, lo que facilita el proceso. Posteriormente se coloca la muestra extraída en tubos de polipropileno inmersos en hielo y finalmente se analiza por citometría de flujo Epics XL (Coulter) con fluorosferas (Beckman Coulter) como control.

4.2 Modelo *Peritonitis por Tioglicolato*.



Figura 4: Modelo de inflamación aguda *Peritonitis por Tioglicolato*.

El modelo de *peritonitis por Tioglicolato* (ver **Figura 4**), se realizó con ratones idénticos al del modelo explicado anteriormente y el protocolo aplicado ha sido descrito previamente por otros autores [155-157].

4.2.1 Material para desarrollar el modelo *Peritonitis por Tioglicolato*.

- Ratones machos no consanguíneos de cepa CD-1 (Swiss), peso 30g, 5-6 semanas de edad. (Laboratorio Jackson).
- Tampón PBS 1× + EDTA 3mM.
- Ketolar 50mg/ml (Ketamina). Uso: 85mg/Kg. (Pfizer).
- Rompun 2%, (Xilacina). Uso: 16mg/Kg (Bayer).
- Tioglicolato. Uso: 3%, 3g/100ml H₂O_d, 500µl por ratón (Oxoid).
- Jeringuillas de 0,5ml (BD Micro-Fine).
- Jeringuillas de 10 ml (BD Discardit).
- Aguja de 21G (BD Microlance).
- Aguja de 25G (BD Microlance).
- Tubos de polipropileno (Falcon Labware, Oxnard, C.A).
- Fluorosferas (Beckman Coulter).
- Citómetro de flujo Epics XL (Coulter).

4.2.2 Método:

Los animales se colocaron en jaulas individuales para mantenerlos en un buen estado físico. Se anestesiaron los ratones con una combinación de Ketolar (85mg/Kg) y Rompun (16mg/Kg). Posteriormente, se realizó el tratamiento IM con los diferentes productos y fármacos a estudiar, aproximadamente 10 min antes de inocular el quimioatrayente. Posteriormente, estos animales se colocaron boca arriba y se administró tioglicolato como quimioatrayente realizando una punción vía intraperitoneal (IP). Transcurridas 4 h., se procedió a sacrificar los animales por dislocación cervical. Seguidamente, se realizó un pequeño corte en la piel del abdomen y se tiró en ambos sentidos, quedando expuesto el peritoneo. Posteriormente, se lavó con 10ml de PBS + EDTA 3mM, se extrajo la muestra (líquido intraperitoneal) tomando precauciones de no tocar las asas intestinales y se colocó en tubos de polipropileno en hielo. Finalmente, se analizó por citometría de flujo con fluorosferas como control.

5. Western blot.

Es una técnica inmunoenzimática, en la cual se separan las proteínas en función de su peso molecular mediante una electroforesis en condiciones des-

naturalizantes, y una detección posterior con anticuerpos específicos contra la proteína que se desea detectar.

Esta técnica se empleó para estudiar la expresión de proteínas de las subunidades A, B y C de los receptores α_2 , así como la VE-Cadherina.

Como material biológico experimental se emplearon HUVEC y PMN humanos. Las HUVEC, (2×10^6 células/punto, se lisaron con 0,25% de Tritón x-100 (Sigma-Aldrich) a 4°C durante 15 min, resuspendiendo cada 5 min. Se emplearon aproximadamente 20×10^6 neutrófilos/punto, procedentes de sangre periférica humana.

Las proteínas se separaron mediante gel de acrilamida con SDS-12%. Se realizó la electroforesis y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se bloquearon las uniones a sitios inespecíficos con 5% de leche en polvo desnatada en tampón TBSt (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM de NaCl, 0.05% Tween 20).

Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C, o 90 min a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos diluidos en TBSt con 0,5% de leche desnatada:

Anticuerpos primarios usados:

- I. Anti- α_2A -AR C-19 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, INC).
- II. Anti- α_2B -AR C-19 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, INC).
- III. Anti- α_2C -AR C-20 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, INC).
- IV. Anti- α -tubulina ratón 1:2000 (Sigma T6074).
- V. Anti- β actina ratón anti humano 1:2000 0,5 μ g/ml (Sigma).
- VI. Anti-VE-Cadherina 1/^{1/2} (Sobrenadante).

Anticuerpos secundarios usados:

- I. HRP cabra anti-conejo (Dako, Denmark) 1:2000.
- II. HRP cabra anti-ratón (Dako, Denmark) 1:2000.

Los anticuerpos secundarios se incubaron 60 min a temperatura ambiente en agitación.

Una vez marcadas las membranas con los diferentes anticuerpos objeto de estudio, se revelaron con ECL *Western Blotting Substrate* (Pierce, Rockford, USA). Posteriormente, se obtuvieron las bandas de proteína mediante una cámara de captación de imágenes (Kodax, Rochester, NY).

6. Citometría de flujo.

La Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrica, cuyo fundamento consiste en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas de una en una por delante de un haz de rayo láser. Se utiliza para el análisis de diferentes tipos celulares, mediante la cuantificación de las características individuales, como puede ser el tamaño y la complejidad.

La CMF se empleó para el análisis de la expresión de moléculas de superficie de las células estudiadas como los neutrófilos humanos, neutrófilos de ratón y HUVEC; así como para cuantificar el número de PMN en las suspensiones biológicas obtenidas de los modelos animales de inflamación aguda.

Las células se conservaron en tubos de polipropileno a 4°C, resuspendidas en 250µl de tampón PBS o HBSS, hasta su análisis. Se estudiaron 5×10^3 células/punto en el citómetro de flujo Epics XL (Coulter) y los datos se representaron en escala logarítmica, luego se procesaron los datos con el software WinMDI 2.9. La fluorescencia producida por el anticuerpo secundario o por los controles de isotipo correspondientes se consideró como control negativo. Los datos se normalizaron para expresar la intensidad de fluorescencia media relativa (IFMr).

La cuantificación de PMN se llevó a cabo usando fluorosferas (Flow-Check, Beckman Coulter) empleadas para el calibrado de citómetros de flujo. Se tomaron como control por sus características estándar de tamaño, complejidad y fluorescencia. Previamente se contaron para determinar la cantidad de fluorosferas /µl de que se disponía. Se fijó el volumen de muestra en 250µl, también se fijó el volumen de fluorosferas en 30µl, lo que nos permitía saber exacta-

mente cuántas fluorosferas habían en el volumen final de 280 μ l. Pasados los 5×10^3 eventos totales por punto, se puede determinar separando por regiones, cuántos eventos corresponden a fluorosferas y cuántos a células. Por regla de tres, se puede determinar con el dato de las fluorosferas, cuántos μ l totales han pasado. Luego, el dato de la región de células se divide entre los μ l totales que han pasado y podemos calcular cuántas células/ μ l tenemos en la muestra.

7. Estudio de la expresión génica mediante RT-PCR

Se realizó la extracción de RNA siguiendo las instrucciones del fabricante con el kit RNAsay Midikit (Qiagen). Las muestras HUVEC y PMN se trataron con DNAsa para eliminar genómico. Posteriormente se realizó la retrotranscripción empleando Superscrip III (Invitrogen) con hexámeros al azar. Las secuencias de oligos que se utilizaron para la PCR fueron:

Adra2a FW: 5' GCTGGCCAACGAGGTCAT 3'

RW: 5' CGCCCTTCTTCTCGATGGA 3'

Amplicón:260pb

Adra2b FW: 5' GCCATCACCTTCCTCATTCTCT 3'

RW: 5' ACGATGGACGAGGTGCAGA 3'

Amplicón:251pb

Adra2c FW: 5' TGGTGGGCTTCCTCATCGTC 3'

RW: 5' CACCACACCTGCCCGAAGTA 3'

Amplicón:202pb

Se empleó una pareja de oligos de β_2 microglobulina como control de carga con secuencia: FW: 5' GCAGCATCATGGAGGTTTGAA 3'

RW: 5' CATGGAGACAGCACTCAAAGTAGAA 3'

Amplicón:181pb

Las condiciones de la PCR en el termociclador (Applied Biosystems) fueron: 1 ciclo de 3 min a 92°C, 40 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 58°C durante 1 min, 72°C durante 40 segundos, posteriormente 1 ciclo de 7min a 72°C y 1 ciclo de 4°C. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1,8% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente el gel se analizó empleando un Transiluminador de ultravioleta (Vilber Lourmat).

8. Estudio del movimiento de Calcio en PMN humanos.

Se aislaron los PMN según se ha descrito en (ver 1.2) y se utilizó un Sorter BD FACS Aria II. El fluorocromo INDO-1 se utilizó para medidas ratiométricas de Ca^{2+} intracelular. La excitación se produce por un láser UV de 355nm; en ausencia de calcio la emisión es azul (500nm) y en presencia de calcio se pierde la emisión azul y pasa a violeta (400nm).

Materiales:

- Sorter BD FACS Aria II.
- INDO-1 AM (Invitrogen) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en DMSO.
- Tampón: PBS o HBSS 1X (10mM HEPES, 1mM CaCl_2 , 1mM MgSO_4 , 1% FBS).
- Yoduro de Propidio (Sigma-Aldrich) 0.05% en agua.
- Ionomicina (Invitrogen).
- Ácido Plurónico F-127 al 0,02% (Molecular Probes).

Método:

Se aíslan PMN como se ha descrito anteriormente, dejándolos a una concentración de 10×10^6 células en 500 μl de tampón. Posteriormente preparar 500 μl de tampón con la sonda (INDO-1) + 0,02% de Ac. plurónico, precalentar 5min y mezclar las células con sonda agitando suavemente. Incubar durante 30min a 30°C en oscuridad y proceder a lavar las células con tampón. Luego se incubó 15min a temperatura ambiente y se añade el Yoduro de propidio a concentración final 0,001%.

Analizar en el Sorter: Precalentar las muestras antes de adquirir a 37°C. Se realizaron medidas durante 5-10 min empezando con la línea base (sin estímulos) y pausando la adquisición para añadir estímulos. Finalmente pausar y añadir Ionomicina como control de carga. El programa de análisis que se empleó fue FlowJo.

9. Estudio de apoptosis en PMN humanos.

Se emplearon PMN obtenidos de donantes sanos, 5×10^6 células/ml en presencia del agonista adrenérgico α_2 UK 14.304 (100 μM), con o sin el antagonista α_2 RX 821002 (100 μM). Los controles fueron células en HBSS conteniendo DMSO (0,1%) o LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como inhibidor de apoptosis. Fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Invitrogen) sin suero del paciente durante 24 h a 37°C con movimiento.

Finalizado el periodo de incubación, las células fueron lavadas y resuspendidas en 5 ml de tampón hipotónico (10 mM HEPES, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl y pH 7,4) al que se le añadieron 50µg/ml de yoduro de propidio en el momento de analizar por citómetro de flujo Epics XL (Coulter) el porcentaje de células con el ADN en estado hipodiploide.

10. Estudio *in vitro* de resistencia eléctrica, permeabilidad y resistencia a la migración celular de endotelio vascular.

Mediante estos estudios se analizó el efecto de los agonistas y antagonistas adrenérgicos α_2 sobre los cambios de permeabilidad endotelial al paso de iones, de macromoléculas y de células.

10.1 Resistencia eléctrica del endotelio vascular

Los experimentos de resistencia eléctrica endotelial se llevaron a cabo en medio estéril (campana de flujo laminar). Se empleó el Amplificador DVC-1000 con electrodos de Ag/AgCl (World Precision Instruments). Los electrodos fueron sumergidos 5min en lejía y posteriormente lavados con tampón PBS estéril. Se procede a compensar la diferencia de potencial de los electrodos usando un pocillo que no tenga células, será el cero (0) de referencia. Con los parámetros de compensación establecidos, se procede a medir la diferencia de potencial en los pocillos con células HUVEC solo con medio y HUVEC con agonista y antagonista adrenérgico α_2 . Del circuito abierto pasamos a voltaje-clamp para comenzar la mediciones imponiendo un potencial de +/- 10-20 mV.

La corriente necesaria para imponer el voltaje se expresa en µA, este dato, y el diámetro de los pocillos de la placa de cultivo empleada (0,33 cm²), nos permiten realizar los cálculos según la Ley de Ohm.

$$1^\circ \mu\text{A}/0,33\text{cm}^2 = \mu\text{A}/\text{cm}^2$$

$$2^\circ \text{mV}/\mu\text{A}/\text{cm}^2 = \text{K}\Omega\text{cm}^2 (*1000) = \Omega\text{cm}^2$$

10.2 Estudio de la resistencia del endotelio al paso de macromoléculas.

Sobre una aproximación experimental igual a la descrita en el apartado anterior, se emplearon placas de 24 pocillos con filtros de 0,4µm (Costar. Corning

Incorporated). Se añadió en el compartimiento superior de la placa empleada dextrano FITC 70.000MW (Invitrogen) 0,5 mg/ml y se incubó a 37°C durante 60 min. Transcurrido este tiempo, se recogió todo el contenido del compartimiento inferior de la placa y se midió la intensidad de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 490 nm y emisión de 520 nm, cada 3 min durante 30 min en un fluorímetro (Spectrafluor Genios, Tecan, Austria).

10.3 Migración estática de PMN.

El estudio de la migración de PMN en condiciones estáticas se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito [158-161] según el modelo de la figura 5.

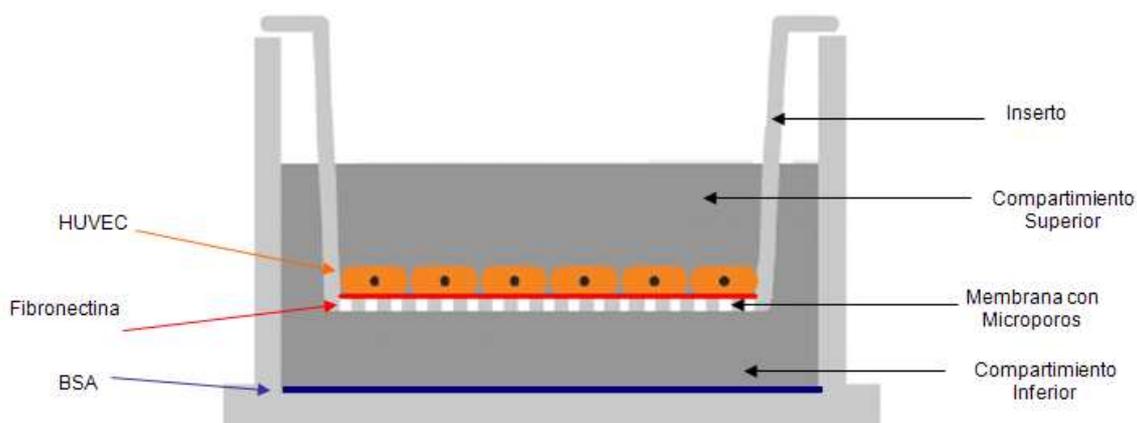


Figura 5: Esquema del sistema para estudiar la migración celular.

10.3.1 Materiales.

El conjunto de elementos necesarios para el desarrollo de la técnica (Figura 5) se describe a continuación:

- Placa de 24 pocillos con filtros de 5 μ m (Costar Corning Incorporated).
- Fibronectina 20 μ g/ml (Sigma).
- BSA 1% (Fluka).
- IL-8 1 μ g/ml (Immunotools).
- TNF α 20ng/ml (Immunotools).
- HUVEC (ver 1.1).
- Medio completo para HUVEC (ver 1.1).
- Medio para PMN solo 0,05% de suero.

- Amplificador DVC-1000 con electrodos de Ag/AgCl (World Precision Instruments).
- Citómetro de flujo modelo: Epics XL, Coulter.

10.3.2 Método:

En primer lugar, se tapizó el compartimiento superior de la placa con 20µg/ml de fibronectina a 37°C durante 60 min. Transcurrido el periodo de incubación, se procede a retirarla y lavar 2 ó 3 veces con PBS 1×. Posteriormente, se sembraron las HUVEC en el compartimiento superior a una concentración de 10×10^4 células/pocillo y se incubaron durante 96h a 37°C, 5% de CO₂. Luego las células fueron activadas con 20ng/ml de TNF-α durante 6 h. Inmediatamente después se trataron con los diferentes fármacos: agonista α₂ UK 14.304, 100 µM y antagonista α₂ RX 821002, 100 µM, durante 30 min a 37°C.

Posteriormente, empleando el amplificador DVC-1000 se midió la diferencia de potencial entre ambos compartimientos, este paso se puede hacer antes y después del tratamiento, según objetivos. El compartimiento inferior del pocillo se bloqueó con 1% de BSA a 37°C durante 60 min. Simultáneamente, se aislaron los PMN (ver 1.2) y se resuspendieron en medio con 0,05% de suero a una concentración de 2×10^5 /100µl. Posteriormente, se añadió en el compartimiento inferior 600µl del medio con 22,5 ng/ml de IL-8 y posteriormente, se colocó el compartimiento superior en los pocillos de la placa y se añadió al mismo 100µl de suspensión de PMN (2×10^5). A continuación, se incubó la placa a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se recogió todo el contenido del compartimiento inferior y se procedió a cuantificar en el citómetro de flujo utilizando fluorosferas como control.

11. Ensayos de interacción dinámica endotelio-neutrófilo en cámara de flujo.

Los ensayos de interacción dinámica se llevaron a cabo *in vitro* simulando el flujo sanguíneo, permitiendo de esta manera el estudio de las vías que intervienen en la cascada de adhesión.

11.1 Materiales.

11.1.1 Tampones.

- Tampón *HBSS*: Tampón con Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ a temperatura ambiente y a 4° C.
- Tampón *HBSS* + 0,5% BSA (albúmina de suero bovino).

11.1.2 Componentes del sistema.

En las **Figuras 6 y 7** se muestran algunos de los componentes del sistema para el ensayo de migración dinámica. A continuación se desglosan cada uno de los componentes del sistema.

- Fibronectina 20µg/ml (Sigma).
- Placas de 35mm estériles, Nunc (Denmark).
- Jeringuillas de 20ml (B/Braun).
- Bomba de succión, Harvard apparatus, 70-2211 (0,84 ml/min lo que supone una presión de 4 dinas/cm² simulando el flujo sanguíneo).
- Equipo calefactor (Warner Instrument Corporation, TC-344B).
- Microscopio invertido de contraste de fases de fluorescencia (Zeiss, Axiovert S10TV) con objetivos de 10× y 20×.
- Mangueras.
- Bomba de vacío.
- Cámara digital (Hamamatsu, Orca, Japón).
- La captura de imágenes se realizó con el programa (Wasabi).
- El análisis se llevó a cabo con el Software Hamamatsu C4742-95.
- La cámara de flujo empleada fue de Glycotech. (0,25 mm altura 5mm ancho x largo).
- Sello de silicona de 5mm de espesor con canal de 0,25mm.
- Llaves de 3 pasos (Braun, Switzerland).



Figura 6: Algunos materiales empleados (Interacción dinámica).

1. Equipo calefactor; 2. Sello de silicona; 3. Cables para temperatura a la placa; 4. Placa calefactora; 5. Placa de 35mm conectada en cámara calefactora con cables de temperatura y mangueras; 6. Pie con jeringuillas; 7. Bomba de infusión-perfusión y elevador; 8. Microscopio invertido; 9. Cámara de fotos; 10. Ordenador para procesar las imágenes.

11.1.3 Método.

Las HUVEC se obtuvieron como se ha descrito previamente (**ver 1.1**). Se incubaron en placas de 35mm con fibronectina, a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ en PBS 1 \times a 37°C durante 1h. Posteriormente, se sembraron 3×10^5 células/placa, suficiente para la confluencia en 24h. Las células fueron activadas con 20ng/ml de TNF- α 10min antes de añadir los diferentes fármacos: agonista $\alpha 2$ UK 14.304, 100 μM y antagonista $\alpha 2$ RX 821002, 100 μM , posteriormente se incubaron durante 6h a 37°C, 5% de CO₂. Paralelamente, se aíslan los PMN procedentes de sangre periférica (**ver 1.2**) y se resuspendieron en 10 ml de HBSS+0,5 % de BSA a 4°C a una concentración de 1×10^6 células/ml. A continuación se preparó la cámara de flujo con las mangueras y el sello de silicona que facilita su adherencia a la placa de 35mm donde se encuentran sembradas las HUVEC (**Fig. 6, N° 2, 4, 5**). Las condiciones del flujo son 20ml de volumen y

4 dinas/cm² de presión. Se realizaron videos a 10x de 3 min a 20Hz (20 imágenes/segundo) en diferentes campos de 1mm² cada uno. Para observar la trans migración de los neutrófilos a través del endotelio se realizan videos, en los cuales dejamos fluir HBBS sin células, con el objetivo de 20x durante 10min a 1Hz (1 imagen/segundo).

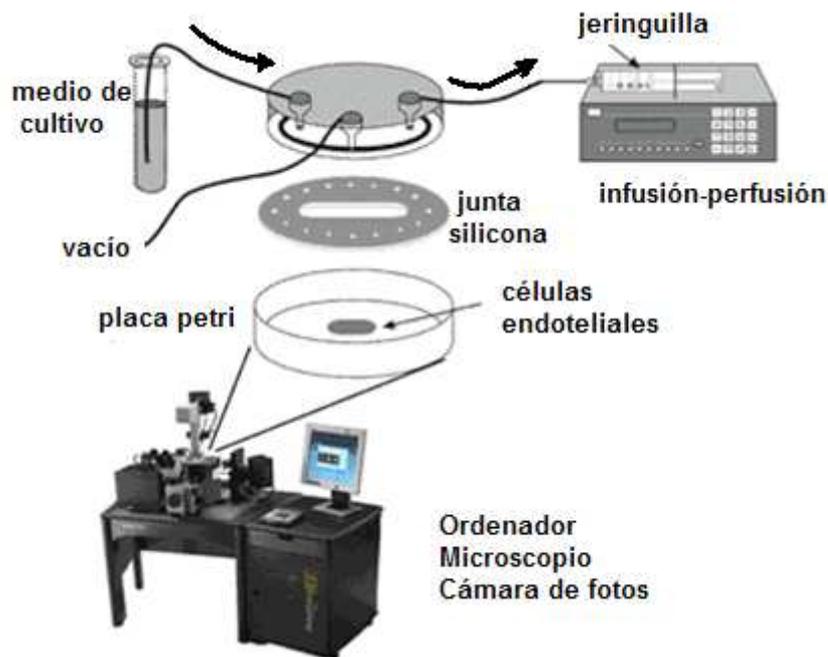


Figura 7: Elementos que componen el sistema de flujo.

11.1.4 Análisis de imágenes.

Para analizar los resultados se empleó el programa Metamorph con el cual se calculó el número de PMN que ruedan/mm²/min, la distancia, el tiempo y la velocidad con que lo hacen por encima de las células endoteliales. La trans migración celular se analizó mediante inspección directa de los videos.

12. Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia (IF) es una técnica que emplea anticuerpos conjugados a fluorocromos. Nos permitió estudiar la intensidad de las uniones endoteliales mediante microscopía confocal.

Los experimentos de (IF) se realizaron con HUVEC sembradas en cámaras de cultivo de 8 pocillos (Nalgene Nunc, Rochester) cubiertos con fibronectina, 20µg/ml a 37°C durante 60min. Una vez las células estuvieron confluentes, fue-

ron activadas con 20ng/ml de TNF- α durante 6h, e inmediatamente después se trataron con los diferentes fármacos: agonista $\alpha 2$ UK 14.304, 100 μ M y antagonista $\alpha 2$ RX 821002, 100 μ M, durante 30min a 37°C. Posteriormente se lavaron y fijaron con 2% de paraformaldehído (Panreac, Barcelona, España) a temperatura ambiente durante 3min. Se permeabilizaron con 0.2% Tritón x-100 (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente durante 5min. Los lugares de uniones inespecíficas se bloquearon con suero de cabra (Sigma-Aldrich) al 1% a temperatura ambiente durante 60min. Luego, las células se incubaron a temperatura ambiente durante 30min con el anticuerpo primario diluido en tampón PBS con suero de cabra al 1%. Después de cinco lavados con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa 488 cabra anti-ratón (Molecular Probes, Oregon, USA) a temperatura ambiente durante 45min. Posteriormente, las células se lavaron y se les añadió medio de montaje con Dapi (Testog Inc, Chicago, USA). Se colocó un cubreobjetos que se selló con laca para evitar la evaporación de la muestra. Finalmente se procedió a la observación de la monocapa celular con un microscopio confocal (Olympus, Hamburgo, Alemania).

Con el fin de cuantificar la fluorescencia de las células marcadas con el anticuerpo anti VE-Cadherina se procedió primero a estimar la señal de fondo (señal no proveniente del marcaje con los anticuerpos) en las inmediaciones de la membrana plasmática. Para ello se delimitaron 5 regiones de área constante en cada una de las células y se calculó su valor medio y desviación estándar. La fluorescencia proveniente de las células marcadas con anti VE-Cadherina se analizó seleccionando regiones de la membrana celular considerando valores positivos de fluorescencia aquellos que eran igual o superior a la media más tres veces la desviación estándar del fondo.

13. Análisis Estadístico.

Los resultados se expresaron como medias aritméticas \pm SE. Para determinar las diferencias significativas entre las medias, se utilizaron los test de Wilcoxon y Pearson para datos pareados.

RESULTADOS

RESULTADOS:**1.- Expresión y funcionalidad de los receptores adrenérgico α_2 en PMN y HUVEC.**

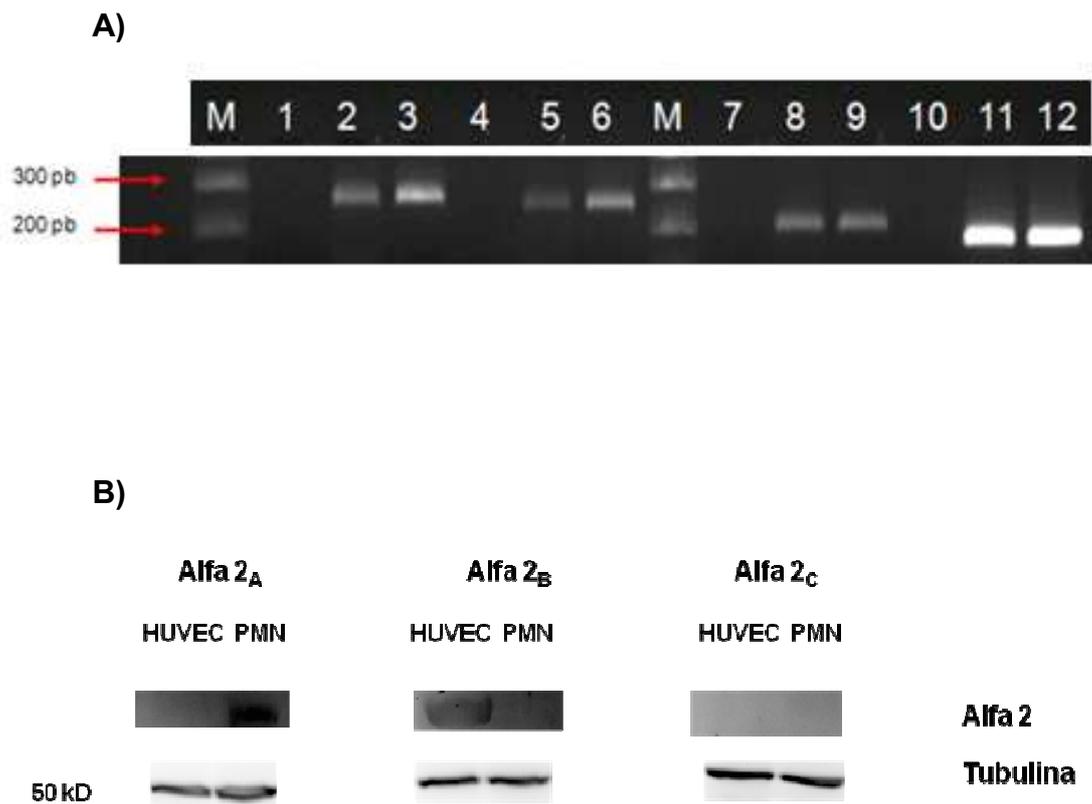
Diferentes trabajos han descrito la presencia de receptores α_2 adrenérgicos en células humanas de diferentes estirpes, como plaquetas [96], células hepáticas, células de la musculatura vascular, terminaciones nerviosas, monocitos, linfocitos [93] y en células endoteliales incluyendo HUVEC [107]. Sin embargo, la presencia de estos receptores en PMN humanos ha sido debatida existiendo en la literatura datos contradictorios; algunos autores afirman que han comprobado la presencia de receptores α_2 adrenérgico en PMN Humanos [108-110, 162], sin embargo otros están en desacuerdo al no obtener respuesta ante diversos estímulos [112] o no detectarlos por medio de ligandos marcados con radiactividad [111].

Como paso previo al estudio de las implicaciones de los receptores α_2 adrenérgicos en la respuesta inflamatoria, decidimos estudiar su presencia en PMN humanos y en HUVEC. Mediante RT-PCR se estudió la presencia de transcritos de las tres subunidades descritas del receptor α_2 adrenérgico en ambas estirpes celulares en condiciones de reposo. Los resultados presentados en la **Figura 1A** muestran que los PMN humanos y las HUVEC expresan ARNm de los tres subtipos de receptores α_2 . Para caracterizar mejor la presencia de estos receptores, se estudio la expresión de proteína de las tres subunidades mediante Western Blot (**Figura 1B**). Se observó proteína inmunoreactiva de la subunidad α_{2A} en PMN y de α_{2B} en HUVEC, sin que fuese posible constatar la expresión de α_{2C} en ninguno de estos dos tipos celulares.

Los receptores α_2 adrenérgicos están unidos a proteínas G y el reconocimiento de su ligando induce cambios en la concentración de calcio intracelular [102]. Este hecho está bien definido en HUVEC. Sin embargo, en PMN existen datos contradictorios según el subtipo de receptor adrenérgico estimulado. Se realizaron experimentos para determinar la capacidad funcional de los receptores agonistas α_2 de movilizar calcio en PMN humanos mediante citometría de flujo según se describe en la sección de Material y Métodos. La **Figura 1C** muestra los movimientos de calcio en linfocitos, monocitos y PMN humanos

cargados con INDO3 (ver Material y Métodos) en respuesta a UK 14.304. Los PMN muestran un modesto, pero consistente incremento del 20%, de la concentración de calcio intracelular al ser incubados con un agonista α_2 . Este dato es respecto a la liberación de calcio que experimentaron los PMN frente al ionóforo (Ionomicina). Los linfocitos y monocitos no mostraron esta respuesta. Estos resultados demuestran que los PMN humanos expresan de forma constitutiva la subunidad α_{2A} de los receptores adrenérgicos α_2 y que estos receptores son capaces de movilizar calcio, al parecer, por una vía alternativa a la que caracteriza a los receptores adrenérgicos α_2 de inhibir la síntesis de AMPc.

FIGURA 1



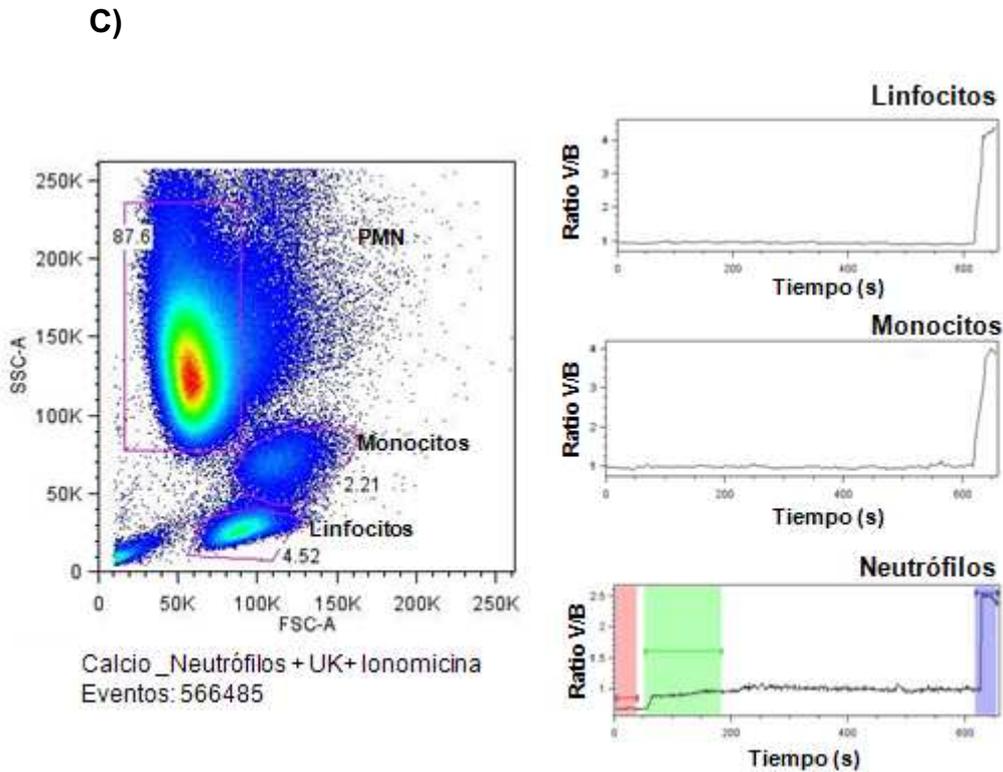


Figura 1: **Expresión y función de las subunidades del receptor $\alpha 2$ adrenérgico en PMN y HUVEC.** **A)** Foto de un gel de agarosa al 1,8% teñido con bromuro de etidio del producto de RT-PCR aislado de células HUVEC y PMN humanos en condiciones de reposo. Referencia de los carriles: **M.** Marcador de 100 pares de bases, **1,4 y 7** controles con agua para PCR de cada subunidad $\alpha 2$. **2** Receptor $\alpha 2_A$, en PMN **3** Receptor $\alpha 2_A$ en HUVEC, **5** Receptor $\alpha 2_B$ en PMN, **6** Receptor $\alpha 2_B$ en HUVEC, **8** Receptores $\alpha 2_C$ en PMN, **9** Receptores $\alpha 2_C$ en HUVEC, **11** y **12** control de carga $\beta_2\mu$ **Globulina** en PMN y HUVEC respectivamente. Se muestra un experimento representativo de 3. **B)** Western blot de proteína aislada de HUVEC y PMN con tubulina como control de carga. Observamos proteína de $\alpha 2_A$ en PMN, $\alpha 2_B$ en HUVEC y de $\alpha 2_C$ no obtuvimos resultados positivos para ninguno de los dos grupos celulares estudiados. **C)** Graficas que representan los movimientos de calcio en leucocitos en respuesta a UK 14.304 mediante citometría de flujo. El *dotplot* muestra la distribución celular por tamaño y complejidad de las tres poblaciones estudiadas. Los histograma representan la relación de fluorescencia violeta/azul (ratio V/B) de linfocitos, monocitos y PMN cargados con INDO1 a lo largo del tiempo en segundos. La zona sombreada en verde corresponde al incremento de la concentración basal de calcio intracelular en respuesta a UK 14.304. La zona sombreada en violeta es el pico de calcio que produce un ionóforo. Se muestra un experimento representativo de 3.

2.- Implicación de los receptores adrenérgicos α_2 en la extravasación de PMN en modelos animales de inflamación aguda.

Basándonos en los resultados anteriores, donde se evidenció la presencia en PMN de, al menos, la subunidad α_{2A} se decidió estudiar la posible implicación de los receptores α_2 sobre la respuesta inflamatoria. Los modelos animales de inflamación permiten simular el proceso inflamatorio de una forma experimentalmente manipulable y, al mismo tiempo, remedan las condiciones naturales en las que se lleva a cabo la respuesta vegetativa del organismo a situaciones de stress. Los modelos utilizados en éste trabajo fueron el *Air Pouch* [140-142] y *Peritonitis por Tioglicolato* [155-157]. En ambos modelos la migración de los PMN disminuyó significativamente en los animales pretratados por vía parenteral con los agonistas α_2 Xilacina (16mg/Kg) y UK 14.304 (1mg/Kg); efecto que fue bloqueado por la administración previa del antagonista α_2 , RX 821002 (5mg/Kg) (**Figura 2A y 2B**).

Ha sido descrito que los agonistas α_2 adrenérgicos tienen efecto hipotermizante [90, 125, 163]. Para descartar el efecto potencial de la hipotermia en la reducción de la migración de los PMN al foco inflamatorio que habíamos observado, se repitieron los experimentos en un grupo de ratones tratados con 16 mg/kg de Xilacina cuya temperatura corporal se mantuvo controlada con una fuente externa de calor. En estas condiciones, la temperatura rectal de los ratones expuestos a la fuente de calor y pretratados con Xilacina era muy similar a la de los controles. Sin embargo, en los ratones que estuvieron bajo los efectos del agonista adrenérgico α_2 en condiciones de temperatura ambiente, la temperatura corporal, tal y como se esperaba, disminuyó de forma relevante **Figura 2C** [90, 125]. El análisis en estas condiciones de la migración de PMN al foco inflamatorio pone de manifiesto que, incluso cuando se controla la temperatura corporal, la activación de los receptores adrenérgicos α_2 continúa produciendo *in vivo* una reducción significativa de la acumulación de PMN en el foco inflamatorio (**Figura 2D**).

Estos resultados sugieren que los receptores adrenérgicos α_2 juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria, interfiriendo en la acumulación de

los PMN en el foco inflamatorio, mediante un mecanismo independiente del descenso de la temperatura corporal.

FIGURA 2

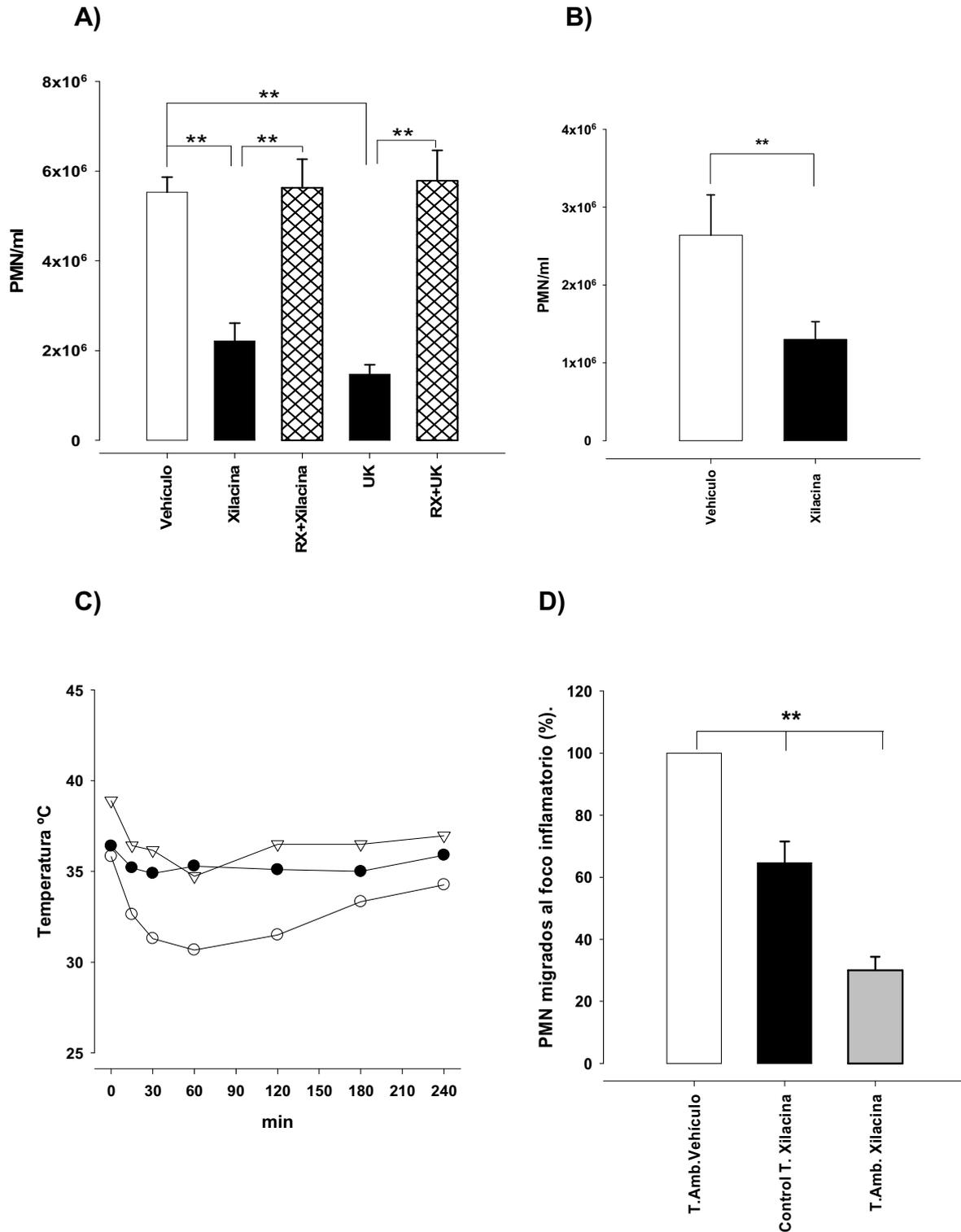


Figura 2: **Efecto de los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ sobre la migración de PMN en el modelo *Air Pouch* y *Peritonitis por Tioglicolato*.** **A)** Modelo *Air Pouch* donde la máxima migración de PMN se observó en los ratones tratados con vehículo (\square) que fueron considerados como control. La administración IM de los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$, UK 14.304, 1 mg/Kg y Xilacina, 16mg/Kg, causó una disminución significativa de la migración de PMN al foco inflamatorio (\blacksquare). Cuando los animales fueron pretratados con el antagonista RX 821002, 5mg/Kg el efecto de ambos agonistas adrenérgicos fue bloqueado. Los datos representan la media \pm ES en cifras absolutas del número de PMN en la bolsa dorsal de 5 experimentos independientes en grupos de 3 animales por condición experimental. **p<0.01 mediante el test de Wilcoxon. **B)** Modelo *Peritonitis por Tioglicolato* donde se observó disminución de la migración de PMN al peritoneo en aquellos animales que fueron tratados con Xilacina como agonista adrenérgico $\alpha 2$ respecto a los considerados como control. n=3 **p<0.01 mediante el test de Wilcoxon. **C)** Variación respecto al tiempo de la temperatura rectal de los ratones tratados con Xilacina, (16mg/Kg), con (∇) o sin (\circ) fuente externa de calor respecto a animales mantenidos a temperatura ambiente (\bullet) sin tratamiento. Se muestra un experimento representativo de 2 independientes. **D)** Efecto de la temperatura sobre la migración leucocitaria en ratones tratados con Xilacina, (16mg/Kg). Los animales fueron tratados con el agonista adrenérgico $\alpha 2$ y fueron mantenidos a temperatura ambiente (\blacksquare) o en condiciones de control de temperatura (\blacksquare). Como control de migración se utilizó un grupo de animales tratados con vehículo mantenidos a temperatura ambiente (\square). Los datos representan la media \pm ES de 3 experimentos independientes con 3 animales cada grupo del número relativo de PMN en la bolsa respecto a los animales controles que fueron tratados sólo con el vehículo y mantenidos a temperatura ambiente, que fue considerada 100%. **p<0.01 mediante el test de Wilcoxon.

3.- Efecto de los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ sobre la expresión de moléculas de adhesión en PMN humanos.

Las moléculas de adhesión juegan un papel esencial en la respuesta inflamatoria. Las selectinas [164] y las integrinas de la familia $\beta 2$, en especial el CD11b [165], participan de forma secuencial en el proceso de extravasación de PMN al foco inflamatorio [72]. La selectina-L se expresa constitutivamente en la superficie de los PMN y se procesa enzimáticamente, liberando al medio su dominio extracelular en respuesta a múltiples estímulos [72]. Por otra parte, el CD11b también se expresa de forma constitutiva en PMN; pudiendo aumentar su expresión en membrana de forma muy marcada bajo determinados estímulos al producirse la fusión de los gránulos terciarios en cuya membrana se almacenan preformados [165]. Debido a la importancia de estas dos moléculas en el proceso de extravasación de PMN durante la respuesta inflamatoria, decidimos estudiar cuál era el efecto que causaban los agonistas $\alpha 2$ sobre su nivel de expresión en neutrófilos humanos.

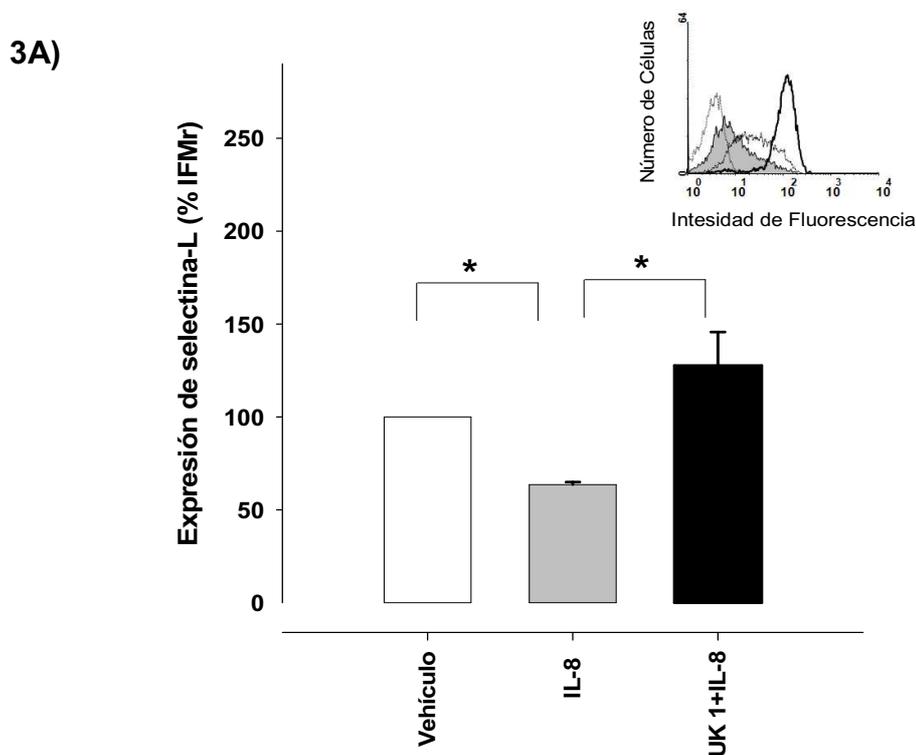
Neutrófilos humanos procedentes de donantes sanos fueron aislados y cultivados en tubos de polipropileno con *HBSS* en presencia o ausencia de agonistas adrenérgicos $\alpha 2$, según se describe en la sección de Material y Métodos. Tras 20 min a 37°C con los diferentes tratamientos, se analizó por citometría de flujo la expresión en la superficie celular de la selectina-L y el CD11b. La **Figura 3A** muestra el efecto de UK 14.304 100 μ M en la expresión de selectina-L en PMN cultivados en medio solo o en presencia de IL-8. La presencia del agonista $\alpha 2$ previno de forma significativa la pérdida de selectina-L inducida por IL-8 en neutrófilos. El incremento de CD11b en presencia de IL-8 también parecía ser modificado por el UK 14.304 (**Figura 3B**).

La acción de la selectina-L durante las fases iniciales de la respuesta inflamatoria depende fundamentalmente de su nivel de expresión en la superficie de los neutrófilos [164]. Sin embargo, las integrinas no dependen solo de su nivel de expresión para realizar su función adhesiva y son capaces de modular dinámicamente su capacidad de unirse a su ligando al sufrir cambios conformacionales en su estructura cuaternaria [30]. Por este motivo decidimos analizar la posibilidad de que los agonistas $\alpha 2$ pudieran modificar la afinidad del

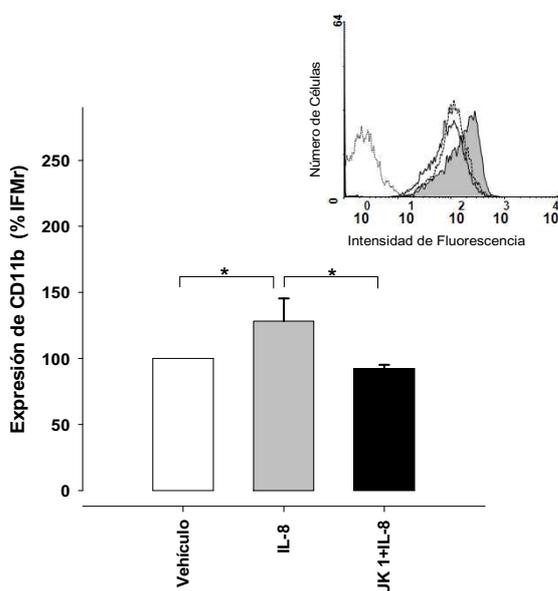
CD11b por su ligando endotelial alterando los cambios conformacionales que producen los activadores. El CBRM1/5, es un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo de activación específico del CD11b humano que no se expresa en el CD11b de PMN en reposo. El epítipo reconocido por este anticuerpo monoclonal se localiza en el dominio de la cadena α de Mac-1 muy cerca del sitio de unión del ligando [166]. Nuestros datos demuestran que el UK14.304 no es capaz de modificar los cambios conformacionales que produce la IL-8 en el CD11b de los PMN humanos medidos por el CBRM1/5 (**Figuras 3C**).

Estos datos demuestran que la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 hace a los neutrófilos menos sensibles a la activación por citoquinas y quimioquinas previniendo la disminución de selectina-L y el movimiento de CD11b. Estos compuestos tampoco interfieren en los cambios conformacionales que sufre el CD11b en respuesta a estímulos. Los cambios en las moléculas de adhesión que hemos estudiado sugieren que los agonistas adrenérgicos α_2 , podrían actuar interfiriendo con alguno de los pasos más avanzados de la cascada de adhesión: la adhesión firme o la extravasación, pero no sobre el rolling.

FIGURA 3



3B)



3C)

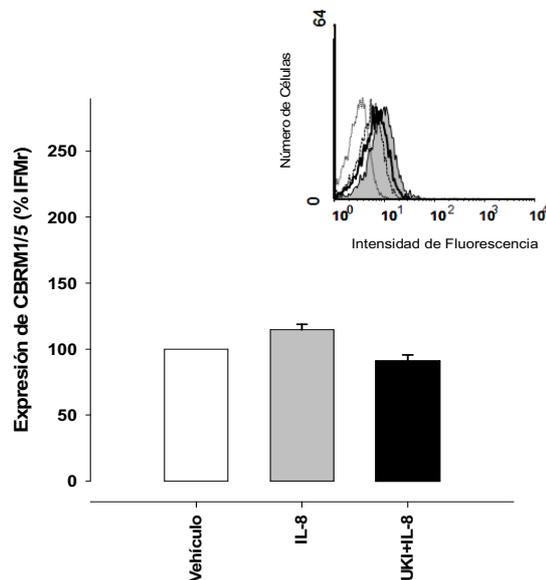


Figura 3: **Efecto de los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ sobre la expresión de selectina-L y CD11b en PMN humanos.** **A)** Diagrama de barras mostrando la variación en la expresión de selectina-L en neutrófilos humanos tras 20 min de incubación a 37°C con IL-8 20ng/ml (■) en presencia o ausencia de UK 14.304 100 μ M (■) respecto a células mantenidas en medio con vehículo (□). Los datos representan la media \pm ES de la IFMr de cinco experimentos independientes respecto de las células mantenidas en medio que se consideró 100%. El inserto muestra un histograma representativo de citometría de flujo en PMN, donde el perfil no sombreado muestra la expresión basal de selectina-L en presencia del vehículo, el sombreado, la expresión en presencia de IL-8, el de trazos discontinuos la expresión de selectina-L en células pretratadas con UK 14.304 y activadas con IL-8. El histograma punteado representa la fluorescencia del clon P3X63 que fue considerado como control negativo. * $p < 0,05$ por el test de Wilcoxon. **B)** Diagrama de barras mostrando la variación en la expresión de CD11b en neutrófilos humanos manejados de la misma forma que en la figura A. Los datos representan la media \pm ES de la IFMr de cinco experimentos independientes respecto de las células mantenidas en medio que se consideró 100%. El inserto muestra un histograma representativo de citometría de flujo en PMN, donde el histograma no sombreado muestra la expresión basal de CD11b en presencia del vehículo, el histograma sombreado muestra la expresión en presencia de IL-8, el histograma en trazos la expresión de CD11b en células pretratadas con UK 14.304 y activadas con IL-8. El histograma punteado representa la fluorescencia del clon P3X63 que fue considerado como control negativo. **C)** Diagrama de barras mostrando la variación de la activación de CD11b medida por el AcM CBRM1/5 en neutrófilos humanos manejados de la misma forma que en la figura A. Los datos representan la media \pm ES de la IFMr de tres experimentos independientes respecto de las células mantenidas en medio que se consideró 100%. El inserto muestra un histograma representativo de la expresión en superficie de CD11b medido por el AcM CBRM1/5 en PMN. El histograma no sombreado muestra la expresión basal en PMN mantenido en medio conteniendo el vehículo, el histograma sombreado, la fluorescencia que produce este AcM en células activadas con IL-8, el histograma en trazos, las células pretratadas con UK 14.302 y estimuladas con IL-8. El histograma punteado representa el control negativo de fluorescencia.

4.- Efecto de los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ sobre la expresión de moléculas de adhesión en HUVEC.

El ICAM-1 es una molécula de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas que reconoce a las integrinas de la familia $\beta 2$. Se expresa constitutivamente en múltiples estirpes celulares, incluyendo las células endoteliales, donde aumenta su nivel basal de expresión cuando son estimuladas, principalmente por citoquinas proinflamatorias [167, 168]. Por el contrario, el VCAM-1, ligando de la integrina $\beta 1$ VLA-4, no se expresa en las células endoteliales en reposo, y solo tras la acción de factores proinflamatorios aparece en su superficie [169, 170]. Ambas moléculas de adhesión intervienen en el reconocimiento de leucocitos por parte del endotelio [168, 171], y juegan un papel esencial en la cascada de adhesión durante la respuesta inflamatoria. Teniendo en cuenta las referencias que existen de la presencia de receptores adrenérgicos $\alpha 2$ en HUVEC [107, 118, 172], así como los datos anteriormente mostrados de expresión de proteínas de al menos una subunidad, la $\alpha 2_B$ en las células endoteliales, decidimos estudiar la implicación de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC en respuesta a estímulos proinflamatorios.

Las HUVEC fueron cultivadas durante 12h con TNF- α 20ng/ml en presencia o ausencia de dosis crecientes de Xilacina (0,008-0,8 μ M) como agonista $\alpha 2$. La expresión en superficie de ICAM-1 y VCAM-1 fue evaluada por citometría de flujo. La Xilacina mostró capacidad para reducir significativamente la sobreexpresión de ICAM-1 en HUVEC activadas con TNF- α de forma dosis dependiente (**Figura 4A**). Sin embargo, el efecto del agonista $\alpha 2$ no fue consistente sobre las variaciones de expresión de VCAM-1 en células endoteliales activadas con TNF- α (**Figura 4B**).

Estos datos sugieren que la activación del receptor adrenérgico $\alpha 2$ reduce la capacidad para sobreexpresar ICAM-1 en las células endoteliales en respuesta a TNF- α . Este efecto puede traducirse en una acción antiinflamatoria a nivel endotelial, reduciendo la capacidad de adhesión firme de los PMN durante la cascada de adhesión.

FIGURA 4

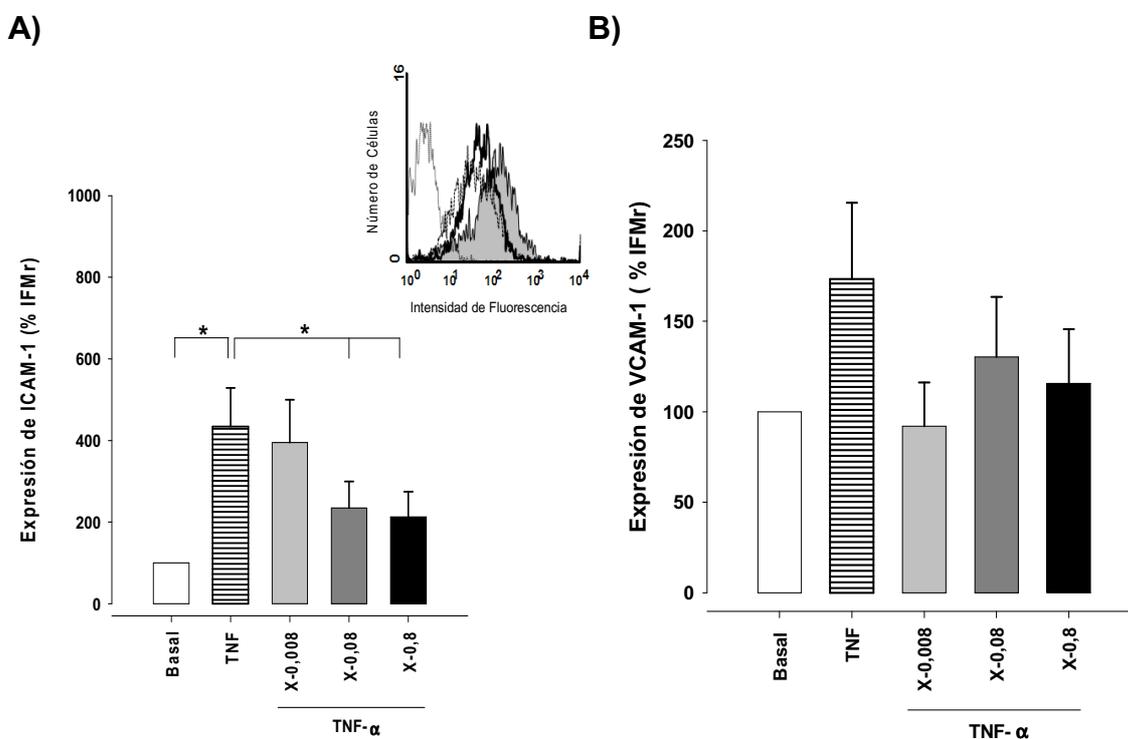


Figura 4: **Acción de agonistas adrenérgicos α 2 sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC.** **A)** Diagrama de barras que representa la variación de la expresión de ICAM-1 en células endoteliales mantenidas en medio solo (□) o activadas con TNF- α en presencia o ausencia de diferentes dosis de Xilacina, 0,008 μ M (■), 0,08 μ M (■), 0,8 μ M (■). Los datos representan la media \pm ES de la IFMr de ICAM-1 de seis experimentos independientes respecto de la expresión basal de células mantenidas en medio que fue considerada 100%. *p<0.05 mediante el test de Wilcoxon. En el inserto el histograma representa la expresión en superficie de ICAM-1 en HUVEC. Las células endoteliales fueron cultivadas durante 12h a 37°C. El histograma no sombreado muestra la expresión basal de ICAM-1 en HUVEC mantenidas en medio, el histograma sombreado representa la expresión de esta molécula en HUVEC cultivadas con TNF- α , el histograma en trazos, las células pretratadas con Xilacina 0,8 μ M y estimuladas con TNF- α . El histograma punteado representa el control negativo de fluorescencia. **B)** Diagrama de barras que representa la variación de la expresión de VCAM-1 en células endoteliales mantenidas en medio (□) o activadas con TNF- α en presencia o ausencia de diferentes dosis de Xilacina (0,008-0,8 μ M) como agonista adrenérgico α 2. Los datos representan la media \pm ES de la IFMr de VCAM-1 de seis experimentos independientes respecto de la expresión basal de células mantenidas en medio que fue considerada 100%.

5.- Evaluación de la capacidad apoptótica de los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ sobre PMN humanos.

Los neutrófilos son esenciales para la defensa del huésped y su muerte por apoptosis es fundamental para la resolución de la inflamación [173]. Los agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos facilitan la entrada de diversas estirpes celulares en el programa de muerte celular [110, 114]. Con el fin de intentar profundizar en los mecanismos responsables de la disminución *in vivo* de la migración leucocitaria que producían los agonistas $\alpha 2$ en los modelos animales que estudiamos, se planteó la posibilidad de que la inducción de apoptosis en PMN pudiera estar jugando algún papel. Se realizaron experimentos para estudiar la influencia de los agonistas $\alpha 2$ en la inducción de apoptosis en PMN humanos.

Se emplearon PMN obtenidos de donantes sanos, 5×10^6 células/ml en presencia del agonista adrenérgico $\alpha 2$ UK 14.304 (100 μ M), con o sin el antagonista $\alpha 2$ RX 821002 (100 μ M). Fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Invitrogen) sin suero del paciente durante 24h a 37°C con movimiento. Los controles fueron células en HBSS conteniendo DMSO (0,1%) o LPS (1 μ g/ml) como inhibidor de apoptosis. Se añadieron 50 μ g/ml de ioduro de propidio en el momento de analizar por citómetro de flujo el porcentaje de células con el ADN en estado hipodiploide. La **Figura 5** muestra que la presencia del agonista $\alpha 2$ no influyó de manera significativa en la viabilidad de los PMN, por lo que el efecto de la disminución de células que migran al foco inflamatorio por los agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos no parece que pudiera ser explicado por la inducción de apoptosis en los PMN.

FIGURA 5

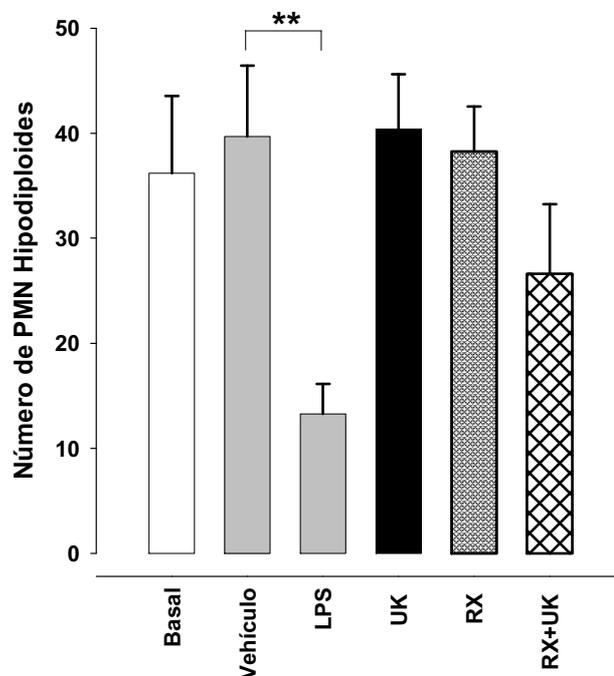


Figura 5: **Análisis de apoptosis en PMN humanos tratados con agonista adrenérgico α_2** . El histograma de barras muestra el % de PMN con una carga de ADN con menos de 2N (hipodiploide). Se tomó como control basal de apoptosis, células cultivadas con medio solo (\square). La presencia del vehículo DMSO 0,1%, UK 14.304 100 μ M (\blacksquare), RX 821002 100 μ M y la combinación de estos dos últimos no parecía tener un efecto significativo en la inducción de apoptosis en PMN humanos ya que el porcentaje de células hipodiploides era similar entre ellos y con la condición basal. Como se esperaba el LPS 1 μ g/ml previno la apoptosis de PMN. Los resultados representan la media \pm ES de los datos absolutos de porcentaje de células apoptóticas de 3 experimentos independientes, ** p <0.01 mediante el test de Wilcoxon.

6.- Efecto de los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ sobre la resistencia eléctrica y el paso de macromoléculas a través de endotelio.

Los datos experimentales que habíamos obtenido demostraban la participación de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos en la modulación de la respuesta inflamatoria *in vivo*. La menor sensibilidad de los PMN y de las células endoteliales a cambiar su perfil basal de expresión de selectina-L y CD11b o ICAM-1 en respuesta a citoquinas proinflamatorias, tampoco parecía que pudiera explicar este efecto. Decidimos entonces investigar como afectaba la activación de los receptores adrenérgicos a la capacidad de barrera de las células endoteliales, estudiando las modificaciones que producían las agonistas $\alpha 2$ en la resistencia eléctrica y el paso de macromoléculas a través de una capa confluyente de HUVEC. Como se describe en la sección de Materiales y Métodos, las HUVEC fueron cultivadas hasta confluencia sobre transwell (\varnothing 0,4 μ m). Luego fueron activadas con 20ng/ml de TNF- α durante 6h. Inmediatamente después se trataron con los diferentes fármacos: agonista $\alpha 2$ UK 14.304, 100 μ M y antagonista $\alpha 2$ RX 821002, 100 μ M, durante 30min a 37°C. Se evaluó la resistencia eléctrica del endotelio para determinar la consistencia de la capa endotelial que se había constituido. Posteriormente se añadió a la cámara superior del transwell Dextrano fluorescente. Después de 1h a 37°C la fluorescencia en la cámara inferior se determinó por fluorimetría. La presencia del agonista $\alpha 2$ UK 14.304 aumentó la resistencia eléctrica de las células endoteliales y redujo la capacidad de difusión del Dextrano, ambos de forma significativa respecto al control. La presencia del antagonista RX 821002 redujo la capacidad del UK 14.304 tanto para aumentar la resistencia eléctrica como de impedir el paso del Dextrano a través de la barrera endotelial (**Figura 6A y 6B**).

Estos datos sugieren que la ocupación de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ en las células endoteliales reduce la permeabilidad del endotelio al paso tanto de iones como de macromoléculas.

FIGURA 6

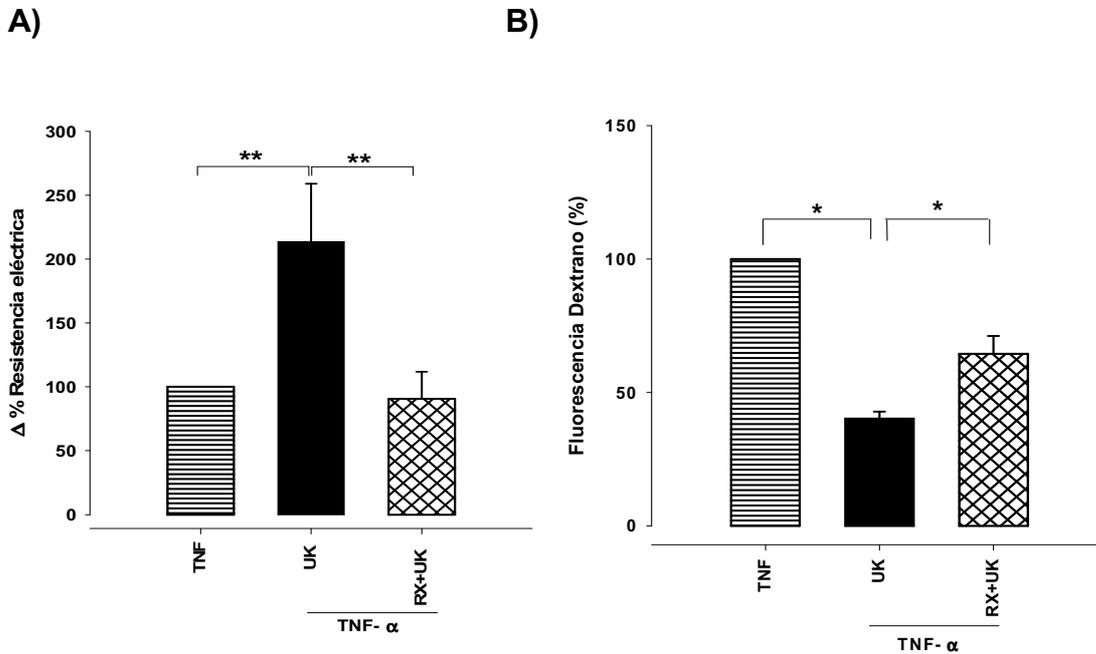


Figura 6: **Efecto de la activación de los receptores adrenérgicos α_2 sobre la resistencia eléctrica y el paso de macromoléculas a través del endotelio vascular.** **A)** Diagrama de barras del efecto de UK 14.304 100 μ M (■) sobre la resistencia eléctrica de una monocapa confluyente de HUVEC activadas con 20ng/ml de TNF- α . Un grupo de neutrófilos fueron pretratados con RX 821002 100 μ M y posteriormente estimulada con UK 14.304 y otro grupo de células fue mantenida en condiciones basales activadas solo con TNF- α . Los datos representan la media \pm ES del porcentaje de variación de la resistencia eléctrica respecto a células que permanecieron en medio y TNF- α a la que se consideró 100%. n=6, **= p <0,01 mediante el test de Wilcoxon. **B)** Diagrama de barras mostrando el paso de Dextrano fluorescente (70.000 MW) en las condiciones que se describen en el panel A. Los datos representan la media \pm ES del porcentaje de fluorescencia en el compartimento inferior respecto a las células que permanecieron en medio y TNF- α a la que se consideró 100%. n=6, *= p <0,05 mediante el test de Wilcoxon.

7.- Efecto de la activación de receptores adrenérgicos $\alpha 2$ endoteliales sobre la transmigración de PMN.

Los resultados previos demostraban que el agonista $\alpha 2$ UK 14.304 aumentaba la resistencia eléctrica del endotelio y reducía el paso de macromoléculas a través de células endoteliales confluentes. Nuestro siguiente paso fue evaluar el efecto de la activación de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos sobre la migración transendotelial de PMN humanos.

Se cultivaron HUVEC hasta confluencia en transwells (5 μm \varnothing) y fueron activadas con 20ng/ml de TNF- α durante 6h. Inmediatamente después se trataron con los diferentes fármacos: agonista $\alpha 2$ UK 14.304, 100 μM y antagonista $\alpha 2$ RX 821002, 100 μM , durante 30min a 37°C. Tras tres lavados, se añadieron PMN no activados en la cámara superior del transwells y en la cámara inferior se colocó IL-8 (20ng/ml) que fue utilizada como quimioatrayente. Para comprobar la implicación de las moléculas endoteliales CD31 y VE-Cadherina en nuestra preparación, se emplearon anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD31 (clon TP1/15.1) y anti VE-Cadherina (clon TEA 1/31.1). La activación del endotelio con TNF- α incrementó de forma significativa la transmigración de los PMN. La presencia de UK 14.304 (100 μM) redujo en casi un 50% respecto al control la migración de células a través del endotelio activado. Este efecto fue revertido por la preincubación del endotelio con el antagonista RX 821002. Los AcM anti-CD31 y anti-VE-Cadherina disminuyeron de forma significativa la migración de PMN mostrando la relevancia de las uniones interendoteliales en el proceso de migración leucocitaria [63, 85, 174, 175] en nuestras condiciones experimentales (**Figura 7A**).

El siguiente paso fue tratar PMN con UK 14.304 (100 μM) y RX 821002 + UK 14.304, ambos a una concentración de 100 μM durante 20min a 37°C y tras dos lavados añadirlos a transwells tapizados con HUVEC activadas con TNF- α en las condiciones descritas anteriormente, pero que nunca habían sido cultivadas en presencia de agonistas $\alpha 2$. Tras 30min se determinó el número de PMN en el compartimento inferior. La **Figura 7B** muestra que la activación de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ en PMN no varía la capacidad basal de las células para migrar a través de una monocapa de células endoteliales.

Estos resultados demuestran que el tratamiento de las HUVEC con UK14.304 como agonista α_2 , pero no el de neutrófilos, interfiere de manera significativa con la transmigración de los PMN en condiciones estáticas.

FIGURA 7

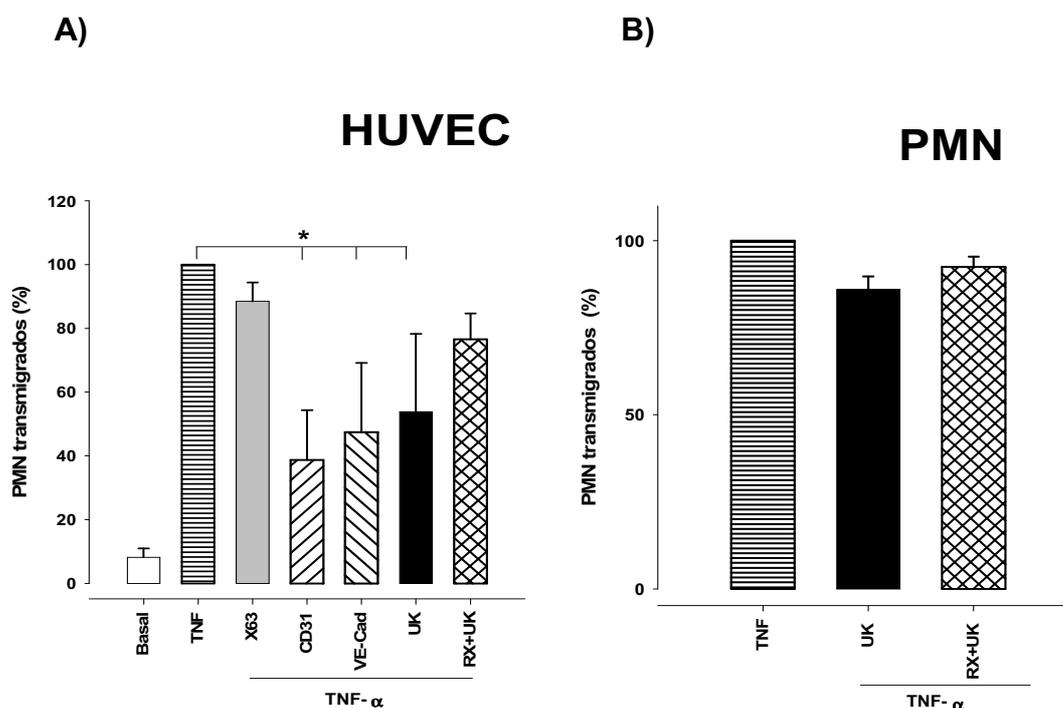


Figura 7: **Papel de los receptores adrenérgicos α_2 sobre la migración a través del endotelio de PMN humanos en condiciones estáticas.** **A)** Diagrama de barras que muestra la migración de PMN a través de endotelio activado con 20ng/ml de TNF- α . Una condición fue el tratamiento con agonista α_2 UK 14.304 (■), otro grupo de células fue pretratada con RX 821002 100 μ M y posteriormente estimulada con UK 14.304, otro punto fue mantenido en condiciones basales activadas solo con TNF- α y un tercer grupo de células fueron tratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD31 y anti-VE-Cadherina. El anticuerpo X63 (■) fue el control de anti-CD31 y anti-VE-Cadherina. Los datos representan la media \pm ES del porcentaje de variación de la migración de PMN respecto a células que permanecieron en medio y TNF- α a la que se consideró 100%. n=3 * = p <0,05 mediante el test de Wilcoxon. **B)** Diagrama de barras que muestra la migración de PMN pretratados con agonista α_2 UK 14.304 (■) y pretratadas con RX 821002 como antagonista α_2 por 20min a 37°C. Las células endoteliales fueron activadas con 20ng/ml de TNF- α . Los datos representan la media \pm ES del porcentaje de variación respecto a la migración basal, que fue considerado 100%. n=3.

8.- Implicación de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ en la transmigración de los PMN a través del endotelio en condiciones dinámicas.

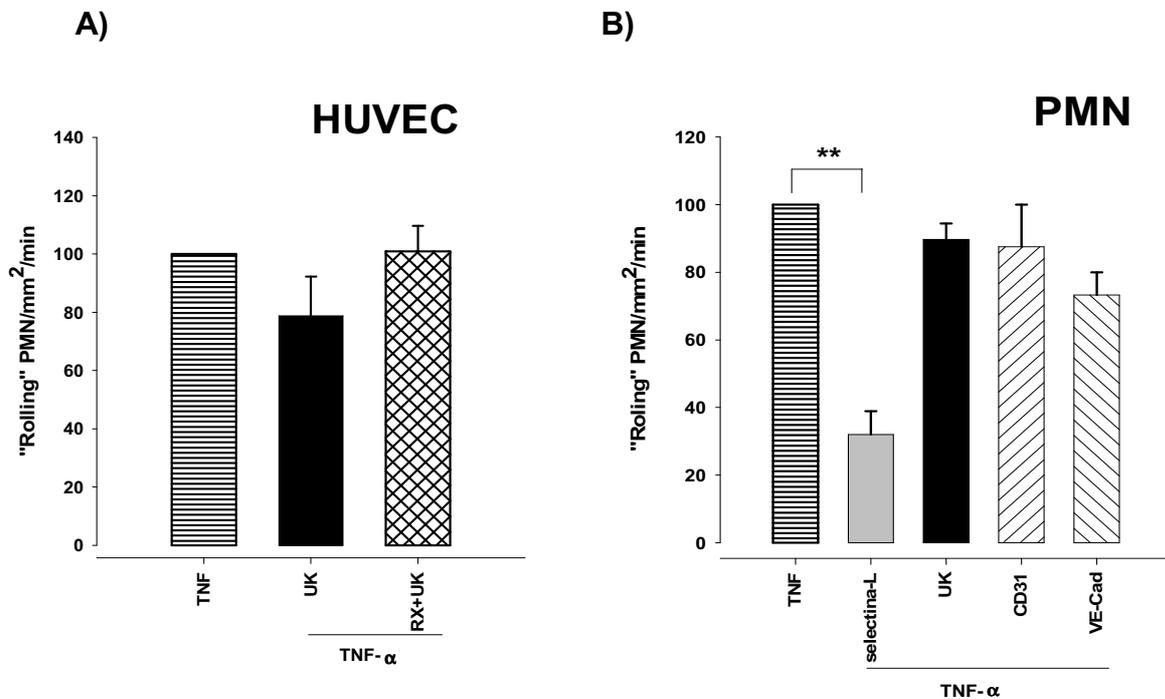
Los datos presentados en el apartado anterior sugieren que la ocupación de los receptores $\alpha 2$ por agonistas en las células endoteliales activadas reduce la capacidad de los PMN de migrar a través del endotelio vascular en un gradiente quimiotáctico. Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si este efecto de los agonistas $\alpha 2$ se reproducía en condiciones dinámicas, que remedan las presentes en las vénulas postcapilares durante la respuesta inflamatoria. Como se describe en la sección de Material y Métodos, la interacción dinámica de los neutrófilos con el endotelio se evaluó mediante una cámara de flujo.

Se cultivaron HUVEC hasta confluencia en placas de 35mm Ø, fueron activadas con 20ng/ml de TNF- α 10min antes de añadir los diferentes fármacos: agonista $\alpha 2$ UK 14.304, 100 μ M y antagonista $\alpha 2$ RX 821002, 100 μ M, posteriormente se incubaron durante 6h a 37°C, 5% de CO₂. Tras tres lavados, se inyectaron los PMN no activados a 4 dinas/cm² en la cámara de flujo. Al igual que en los experimentos de transmigración estáticos, este ensayo se controló con anticuerpos monoclonales anti-CD31 y anti-VE-Cadherina. Se contabilizaron los PMN que hacían *rolling* sobre el endotelio vascular durante 9min. La **Figura 8A** muestra que el tratamiento de las HUVEC con el agonista UK14.304 no afectó la capacidad basal de hacer *rolling* de los PMN. Cuando se trataron los PMN con el agonista $\alpha 2$ durante 20 min y tras dos lavados se introdujeron en la cámara de flujo, su habilidad para hacer *rolling* sobre HUVEC activadas, pero no tratadas con $\alpha 2$ adrenérgicos fue similar al de los controles. Como era de esperar, el AcM anti-selectina-L (Dreg56) impidió significativamente el *rolling* de PMN mientras que los anticuerpos anti CD31 y anti VE-Cadherina no mostraron ningún efecto significativo en esta fase inicial de la cascada de adhesión (**Figura 8B**). Se observa que el tratamiento de los PMN y el endotelio con el agonista $\alpha 2$ no interfieren en la capacidad de los PMN para rodar sobre el endotelio vascular

Después de estudiada la primera fase de la cascada de adhesión se analizó la capacidad de transmigración de los PMN adheridos al endotelio tras la fase de *rolling*. Se contabilizaron las células que hacían diapédesis durante 7min

manteniendo la presión de flujo con tampón sin células. Se observó una reducción significativa en la capacidad de trans migración de los PMN en un 60% sobre el endotelio tratado con agonista α_2 , efecto que se revertió con el antagonista (**Figura 8C**). La presencia de anticuerpos anti CD31 y VE-Cadherina interfirió significativamente la trans migración de PMN en esta fase de la cascada de adhesión. Estos datos demuestran que los agonistas α_2 son capaces de interferir a nivel endotelial en la extravasación de los PMN durante las fases tardías de la cascada de adhesión.

FIGURA 8



C)

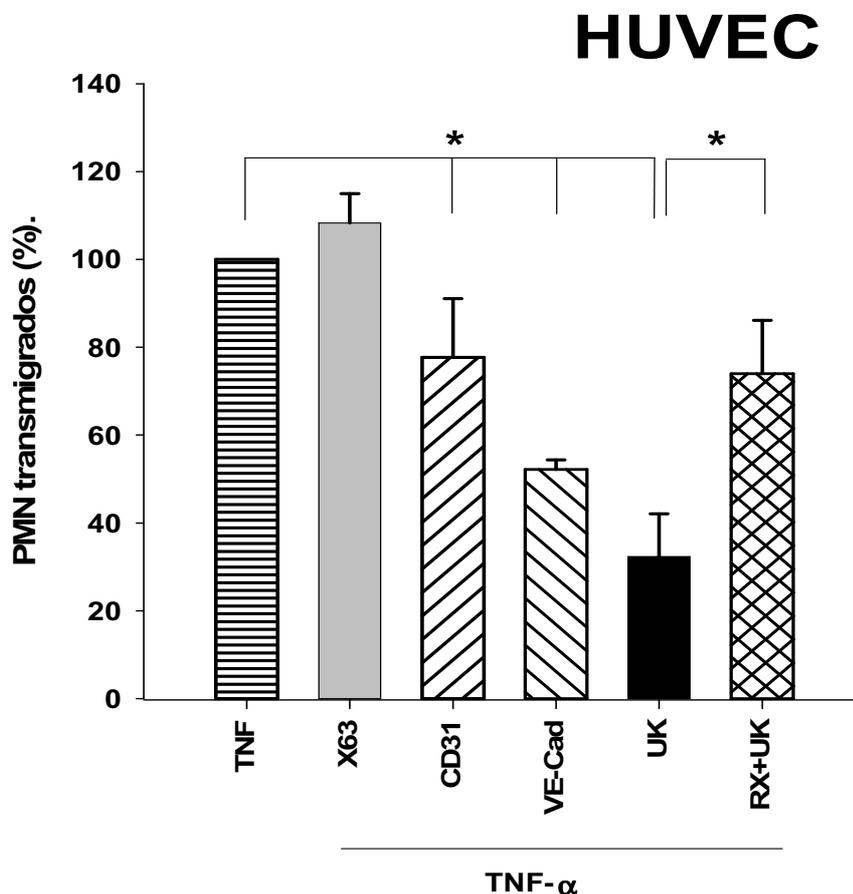


Figura 8: **Implicación de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ en la migración transendotelial de PMN humanos en condiciones dinámicas.** **A)** Diagrama de barras donde se representa el efecto del tratamiento de PMN con agonista $\alpha 2$ UK 14.304 100 μ M (■) y antagonista RX 821002 en su rodamiento sobre HUVEC activadas con 20ng/ml de TNF- α durante 6h a 37°C. Los datos representan la media \pm ES del porcentaje de variación respecto al rolling con TNF, que fue considerado 100%. n=8. **B)** Diagrama de barras mostrando el efecto del tratamiento de HUVEC activado con 20ng/ml de TNF- α durante 6h a 37°C con agonista $\alpha 2$ UK 14.304 100 μ M (■) sobre el rolling de PMN. AcM bloqueantes anti-selectina-L, anti-CD31 y anti-VE-Cadherina fueron usados como controles. Los datos representan la media \pm ES del porcentaje de variación respecto al rolling con TNF- α , que fue considerado 100%. n=4 **= p <0,01 mediante el test de Wilcoxon. **C)** Diagrama de barras mostrando el efecto endotelial de UK 14.304 100 μ M (■) y su combinación con el antagonista RX 821002 sobre la trans migración de PMN a través de HUVEC activadas como se describe en los apartados anteriores. AcM bloqueantes anti-selectina-L, anti-CD31 y anti-VE-Cadherina fueron usados como controles. Los datos representan la media \pm ES del porcentaje de variación respecto a la migración con TNF, que fue considerado 100%. n=3. *= p <0,05 mediante el test de Wilcoxon.

9.- Efecto de los agonistas $\alpha 2$ sobre la expresión de VE-Cadherina en HUVEC.

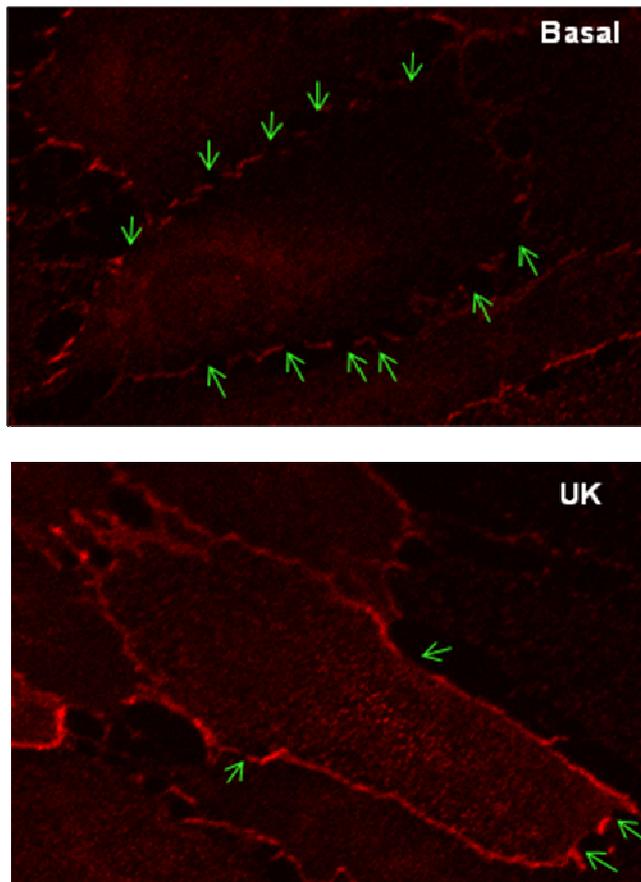
Los datos de los experimentos de transmigración en cámara de flujo sugerían que la activación de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ endoteliales interfería selectivamente con la última fase del proceso de transmigración, el proceso por el cual los PMN se abren paso entre las uniones laterales de las células endoteliales. Por este motivo se decidió estudiar si el UK 14.302 tenía algún efecto sobre las uniones intercelulares de las HUVEC. Se utilizó microscopia confocal para evaluar la expresión de la VE-Cadherina en los espacios interendoteliales.

Las HUVEC fueron cultivadas hasta confluencia, posteriormente se activaron con 20ng/ml de TNF- α durante 6h. Inmediatamente después se trataron con los diferentes fármacos: agonista $\alpha 2$ UK 14.304, 100 μ M y antagonista $\alpha 2$ RX 821002, 100 μ M, durante 30min a 37°C. Las uniones intercelulares fueron marcadas con TEA 1/31.1 AcM anti-VE-Cadherina y se evaluaron las zonas marcadas con anticuerpo según se describe en el apartado de Material y Métodos. Respecto a las condiciones basales, las uniones laterales de las células tratadas con UK 14.304 mostraron una mayor área positiva para VE-Cadherina (**Figura 9A**). La superficie de contacto intercelular que mostraba inmunorreactividad para VE-Cadherina se incrementó en un 50% en células cultivadas en presencia del agonista adrenérgico $\alpha 2$ UK 14.304. La presencia de RX 821002 revirtió parcialmente este efecto (**Figura 9B**). Estos datos apuntaban a que el agonista $\alpha 2$ adrenérgico aumentaba el nivel de expresión de VE-Cadherina de las HUVEC. Mediante Western Blot se confirmó este efecto (**Figura 9C**).

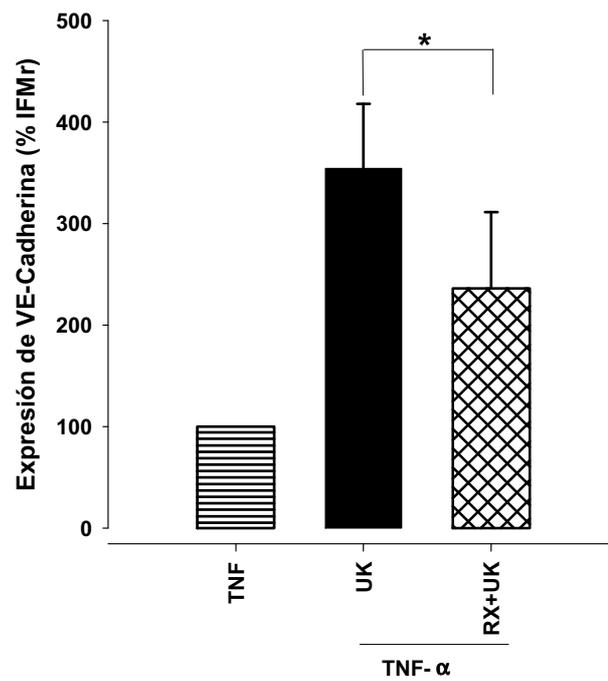
Estos datos sugieren que los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ aumentan las interacciones intercelulares en las HUVEC, pudiendo interferir en los procesos de extravasación de PMN que requieren, en su última fase, la relajación de las uniones interendoteliales para permitir el paso de los leucocitos al foco inflamatorio.

A)

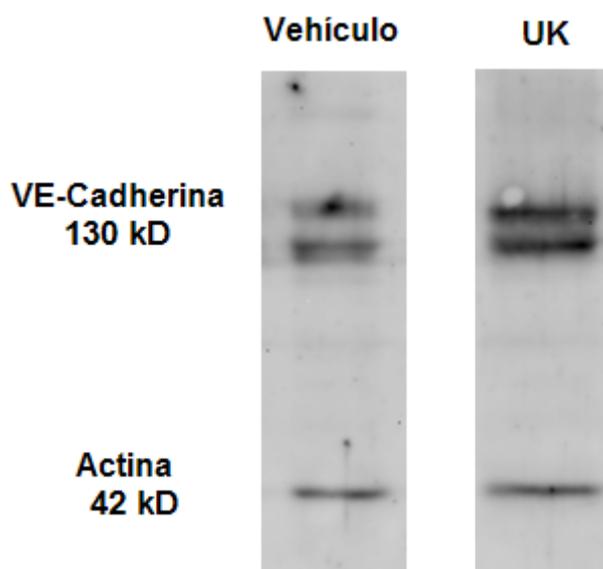
FIGURA 9



B)



C)



Cuantificación: Porcentaje del volumen de pixeles.

	Vehículo	UK
VE-Cadherina	18,16%	31,82%
Actina	9,12%	11,92%
Relación VE/Actina	2	3

Figura 9.- **Expresión de la VE-Cadherina en las uniones intercelulares de HUVEC tratadas con un agonista adrenérgico $\alpha 2$.** **A)** Foto representativa de inmunofluorescencia mediante microscopia confocal (X400) donde se observa la tinción de VE-Cadherina en el eje Z de células HUVEC mantenidas en condicional basales y cultivadas con el agonista adrenérgico $\alpha 2$ UK 14.304. Las flechas muestran las zonas sin tinción para VE-Cadherina. **B)** Diagrama de barras muestra la cuantificación de la superficie intercelular de las HUVEC positiva para VE-Cadherina. Las células fueron cultivadas hasta confluencia y tratadas en presencia y ausencia de UK 14.304 100 μ M (■) o RX 821002 + UK 14.304 (ambos 100 μ M) durante 30min. Los datos representan la media \pm SE del porcentaje de variación en la superficie de las células positiva para la VE-Cadherina respecto al control, que fue considerado 100%. n=4 *p <0,05. **C)** Western Blot de HUVEC crecidas hasta confluencia y tratadas con UK 14.304 (100 μ M) durante 30 min a 37°C. Como control se utilizaron HUVEC mantenidas en medio en presencia del vehículo. La tabla muestra la cuantificación de las bandas respecto a la actina que se utilizó como control de carga.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN:

Los principales hallazgos de esta tesis son: 1) los neutrófilos humanos expresan de forma constitutiva receptores adrenérgicos funcionales del subtipo α_{2A} , 2) los agonistas de los receptores adrenérgicos α_2 tienen un efecto antiinflamatorio *in vivo* reduciendo la capacidad de los neutrófilos para acumularse en los focos de inflamación, 3) este efecto no parece deberse a una acción sobre los neutrófilos y por último, 4) los agonistas adrenérgicos α_2 parecen ejercer su efecto antiinflamatorio al aumentar la intensidad de las uniones laterales de las células endoteliales incrementando su resistencia al paso de los neutrófilos circulantes.

Los receptores adrenérgicos α_2 median una parte de los efectos biológicos que producen las catecolaminas endógenas.

Debido a la ausencia de ligandos farmacológicos específicos para cada uno de los subtipos de receptores adrenérgicos α_2 descritos hasta la actualidad, (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}), hace que sus funciones biológicas sean poco conocidas. El estudio del fenotipo de animales deficientes en cada una de estas formas del receptor adrenérgico α_2 , ha permitido determinar, por ejemplo, que los receptores α_{2A} disminuyen la presión sanguínea, mientras que los α_{2B} la aumentan, la inhibición del loop presináptico que regula la liberación de neurotransmisores en los nervios adrenérgicos requiere una acción sinérgica de los receptores α_{2A} y α_{2C} o que la nocicepción es controlada a diversos niveles por las tres isoformas de α_2 [176].

Los tres subtipos de los receptores adrenérgicos α_2 , están ampliamente representados en el sistema nervioso central y en los tejidos periféricos [177, 178], sin embargo la densidad de expresión y el subtipo predominante difieren ampliamente dentro de un mismo órgano o sistema. Se han descrito transcritos de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos α_2 en múltiples tejidos y estirpes celulares como en plaquetas [129], riñón [179] y estómago [180]. Desde el punto de vista farmacológico, la presencia de receptores adrenérgicos α_2 ha sido ampliamente demostrada en vasos sanguíneos de diversos animales [181, 182]. En este trabajo comprobamos por RT-PCR que las HUVEC en cul-

tivo contenían ARNm de cada una de las tres subunidades descritas de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$. Sin embargo, a nivel de proteína, solo fuimos capaces de detectar la subunidad $\alpha 2_B$ en este tipo de células endoteliales. Aunque existen datos desde el punto de vista farmacológico que sugieren la presencia y capacidad funcional de receptores adrenérgicos $\alpha 2$ en HUVEC [172], no hay referencias en la literatura de estudios a nivel de proteína sobre los subtipos de receptores que expresan las células endoteliales de cordón umbilical humano. Un trabajo realizado mediante estudios de respuesta farmacológica ha sugerido que el endotelio de los vasos mesentéricos de rata expresan selectivamente receptores $\alpha 2_A$ [183]. Estos experimentos difieren de los nuestros en la aproximación experimental, atribuyen selectividad a diversos agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ y están realizados en un roedor, sin embargo, es posible que los diferentes tipos de células endoteliales existentes en el humano expresen diferentes subtipos de receptores adrenérgicos $\alpha 2$ y muestren una respuesta biológica diferencial a sus agonistas tanto naturales como sintéticos.

A diferencia de la bien establecida presencia de receptores β adrenérgicos en los linfocitos, solo unos pocos estudios han descrito la presencia de receptores α en células mononucleares de sangre periférica [184, 185]. La evidencias sobre la presencia de estos receptores en leucocitos son indirectas y se han basado, bien en estudios demostrando que los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ pueden inhibir determinadas acciones de las catecolaminas en estas células del sistema inmune [162, 186, 187], o en estudios de unión de agonistas marcados con radioactividad [185]. En lo que respecta a las células polimorfonucleadas, existen también referencias indirectas sobre la presencia de receptores adrenérgicos $\alpha 2$ en la membrana de los neutrófilos humanos estudiando la unión de agonistas radiactivos [108]. Sin embargo, diversos autores rechazan la presencia de estos receptores al no observar efectos biológicos de agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ en neutrófilos [109-112]. Los datos que presentamos en este trabajo demuestran que los neutrófilos humanos expresan constitutivamente receptores adrenérgicos $\alpha 2$. Al igual que en las HUVEC, nuestros datos muestran que los neutrófilos humanos presentan, de forma constitutiva transcritos de las tres subunidades descritas de los receptores $\alpha 2$, aunque, a nivel de proteí-

na solo hemos sido capaces de detectar la subunidad α_{2A} de los receptores adrenérgicos en estas células.

La presencia de receptores α_2 en neutrófilos es importante por sí misma, aunque demostrar la capacidad funcional de estos receptores incrementaría su relevancia biológica en estas células. Es bien conocido que los receptores α adrenérgicos se acoplan a proteínas G para enviar señales al interior de las células. Los receptores α_2 señalizan mediante el complejo Gi/Go que inhibe la adenilato ciclasa, reduce la concentración de AMPc y tiende a disminuir los niveles de calcio intracitoplasmáticos [88]. Mediante el INDO1 estudiamos los posibles cambios de la concentración intracelular de calcio en leucocitos de sangre periférica de donantes sanos. Los linfocitos y monocitos humanos no mostraron cambios en la concentración basal de calcio intracelular en respuesta al agonista adrenérgico α_2 , UK 14.304. Sin embargo, cuando estudiamos la población de neutrófilos en condiciones de no activación observamos que este agonista inducía un pequeño pero consistente incremento en la concentración de calcio intracelular respecto al ionóforo empleado. Este tipo de respuestas del calcio a agonistas α_2 ya ha sido observada y parece deberse a movimientos del pool intracelular de este ión de forma independiente de la inhibición de la adenilato ciclasa [188]. Incrementos de la concentración de calcio intracelular ha sido descrita utilizando adrenalina y dexmetomidina, un potente agonista adrenérgico α_2 , tanto en plaquetas [189], como en astrocitos [190] y en células de eritroleucemia [188]. Interpretamos nuestros resultados de movimientos de calcio como una demostración de la existencia de receptores α_2 adrenérgicos en neutrófilos humanos.

Muchos procesos que cursan con una respuesta inflamatoria anómala tienen en común una alteración de la regulación del sistema inmune y de las vías del stress [127]. Dos vías de stress, el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y el sistema nervioso simpático regulan la respuesta inmune a través de la liberación de glucocorticoides y norepinefrina, respectivamente. La norepinefrina reconoce receptores de membrana (receptores α y β_1 adrenérgicos) expresados por las células implicadas en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, el efecto de los receptores adrenérgicos en la inflamación ha sido escasamente estudiado

respecto de sus acciones sobre el sistema nervioso y el cardiovascular. Está bien demostrado que el tratamiento combinado de esteroides y agonistas β_1 es más efectivo que cada uno de ellos por separado en el control de los síntomas y la función pulmonar de los pacientes con asma [132]. Un efecto similar se ha descrito entre cortisol y norepinefrina en la producción de citoquinas proinflamatorias en sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide [133] y la estimulación β -adrenérgica ha mostrado un efecto inhibitor de la interacción de neutrófilos humanos con HUVEC *in vitro* [131]. En lo que respecta a los receptores α_2 en la respuesta inflamatoria, se ha demostrado un efecto central antiinflamatorio tras la administración intratecal de la clonidina en el modelo animal de *peritonitis por tioglicolato*, a través de la activación de receptores muscarínicos M2 espinales [191]. A nivel periférico, los agonistas α_2 , pero no los α_1 son capaces de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias en un modelo animal de inflamación pulmonar [119] y las células endoteliales responden a la estimulación α_2 aumentando la producción de óxido nítrico [130], molécula que atenúa la interacción neutrófilo-endotelio. Sin embargo, la implicación real de la señalización por estos receptores, los subtipos comprometidos y los mecanismos a través de los cuales los receptores α_2 adrenérgicos ejercen un efecto antiinflamatorio a nivel periférico no han sido esclarecidos. Nuestros datos utilizando dos modelos animales de inflamación aguda, el *air pouch* y la *peritonitis por tioglicolato*, demuestran que la administración sistémica, por vía intramuscular de dos agonistas adrenérgicos α_2 como la xilacina y el UK 14.304 inhiben de forma significativa el reclutamiento y acumulación de neutrófilos en los focos de inflamación *in vivo*. El tratamiento de los animales con el antagonista α_2 adrenérgico RX 821002 previno el efecto antiinflamatorio de la xilacina.

Los agonistas α_2 inducen hipotermia *in vivo* [125, 192] y apoptosis en neutrófilos [110], efectos que podrían explicar, al menos parcialmente el efecto antiinflamatorio [173] que habíamos observado. Nuestros datos mostraron que el control físico de la hipotermia que producen estos compuestos en los animales no afectó significativamente la acción antiinflamatoria de la xilacina y que el UK 14.304 no indujo *in vitro* la apoptosis en neutrófilos. Estos resultados en conjunto sugieren, que la señalización por receptores α_2 ejerce una acción an-

tiinflamatoria interfiriendo en el reclutamiento de los neutrófilos en los focos de inflamación, posiblemente por una acción periférica directa sobre los neutrófilos circulantes y/o las células endoteliales de los vasos sanguíneos, ya que la disminución del número de células que migraban al foco inflamatorio en los modelos animales empleados, no podría explicarse ni por hipotermia, ni por inducción de apoptosis. Estos datos demuestran que los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ fuera del sistema nervioso central son capaces de modular la respuesta inflamatoria.

Las células endoteliales posicionadas entre la sangre y los tejidos regulan la migración de los leucocitos circulantes hacia los tejidos mediante la modificación del repertorio de moléculas de adhesión de su superficie en respuesta a factores solubles proinflamatorios. Durante la respuesta inflamatoria se establecen entre leucocitos y células endoteliales una secuencia de eventos adhesivos perfectamente orquestados en fases consecutivas que finalizan con la acumulación de leucocitos en los tejidos inflamados, a lo que se denomina cascada de adhesión [32]. Durante la cascada de adhesión, la interacción inicial entre los neutrófilos circulantes y las células endoteliales está mediada por las selectinas. Estas interacciones causan que el neutrófilo reduzca su velocidad de circulación comenzando a rodar sobre el endotelio, *rolling*. A continuación, el Mac-1 (integrina $\alpha M\beta 2$, CD11b) del PMN interacciona con el ICAM-1 (*intercellular adhesión molecule-1*) endotelial, lo que produce el fin del *rolling* y la adhesión firme del neutrófilo al endotelio. En la última fase de la cascada, el PMN se abre paso entre las células endoteliales (diapédesis) migrando hacia el foco inflamatorio [54]. Esta última fase es regulada por moléculas como el CD31 (PECAM-1, *platelet-endothelial cell adhesión molecule 1*), CD99, VE-Cadherina o miembros de las *JAM* (*junctional adhesión molecules*) [193]. Actualmente es posible analizar mediante ensayos sencillos y reproducibles el efecto funcional de nuevos fármacos sobre los diferentes pasos de la cascada de adhesión [13]. Cuando estudiamos el efecto del agonista UK 14.304 sobre el nivel de expresión de selectina-L y CD11b en neutrófilos humanos, no observamos efecto relevante de este agonista $\alpha 2$ en la expresión basal de ambas moléculas de adhesión. Sin embargo, al activar a los neutrófilos con IL-8, una quimioquina

ampliamente implicada en la activación de neutrófilos durante la cascada de adhesión [194], en presencia de UK 14.304 se observó una menor sensibilidad de los neutrófilos a perder selectina-L e incrementar CD11b en respuesta a esta quimioquina. Datos compatibles con estos, en términos de respuesta de selectina-L y CD11b, han sido obtenidos activando neutrófilos con N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP) en presencia de epinefrina [136]. Cuando estudiamos el efecto del agonista $\alpha 2$ sobre las variaciones del nivel de activación de CD11b, medido por el anticuerpo CBRM1/5, en respuesta a IL-8, también se observó una tendencia de los neutrófilos cultivados en presencia de UK 14.304 a reducir el grado de activación de CD11b. Sin embargo, es posible que la menor unión de CBRM1/5 a neutrófilos activados con IL-8 en presencia del agonista $\alpha 2$ pudiera deberse a la menor expresión global de CD11b en estas condiciones, y no solo a un menor nivel de activación de la integrina. Estos datos sugieren que la señalización por receptores adrenérgicos $\alpha 2$ hace a los neutrófilos menos sensible a la activación por factores proinflamatorios. Un efecto similar de menor respuesta a citoquinas proinflamatorias por los neutrófilos ha sido descrito para algunos AINE como el piroxicam, la fenilbutazona o el meloxicam, atribuyéndosele a esta acción una parte de la responsabilidad en la actividad antiinflamatoria de estos compuestos [13].

El endotelio vascular participa de una forma decisiva en la respuesta inflamatoria delimitando la zona en la que los leucocitos deben transmigrar hacia los tejidos. Esto lo hace regulando el nivel de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en su cara endotelial en respuesta a factores proinflamatorios. Sobre la inducción de la expresión de VCAM-1 por TNF- α , ligando de la integrina $\beta 1$, VLA-4 [54], los agonistas $\alpha 2$, no mostraron ninguna acción relevante. ICAM-1 reconoce fuertemente a las integrinas $\beta 2$, como el CD11b en los neutrófilos y es responsable de la adhesión firme de los leucocitos al endotelio durante la cascada de adhesión [54]. Nuestros datos muestran que la activación de los receptores adrenérgico $\alpha 2$ en las HUVEC reduce de forma dosis dependiente su capacidad para sobreexpresar ICAM-1 en respuesta a TNF- α . Este efecto sobre la expresión de ICAM-1 en las células endoteliales junto a la menor respuesta de los neutrófilos a incrementar el CD11b, manteniendo la expresión de selectina-

L, sugería que la acción antiinflamatoria de los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ no se ejercía en la fase de *rolling* (dependiente de selectina-L), siendo más probable que estos receptores interfirieran con fases más tardías de la cascada de adhesión; en la fase de adhesión firme o en la extravasación. Los datos obtenidos en experimentos estudiando la capacidad de UK 14.304 sobre la resistencia eléctrica del endotelio y sobre su capacidad para permitir el paso de macromoléculas demostraron que la ocupación de los receptores adrenérgicos $\alpha 2$ en células endoteliales causó un incremento de la resistencia del endotelio al paso tanto de iones, como de macromoléculas. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado que la clonidina reduce significativamente el transporte paracelular de macromoléculas utilizando como modelo de epitelio células Caco-2 [195]. Estos resultados junto a los datos obtenidos durante los experimentos de migración transendotelial de neutrófilos en condiciones estáticas (transwells) o dinámicas (cámara de flujo) sugerían que era la célula endotelial y no los neutrófilos circulantes la principal diana del efecto antiinflamatorio que mostraban *in vivo* los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$.

La fase final de la cascada de adhesión requiere el paso transendotelial de los leucocitos para acumularse en los tejidos. Aunque se ha descrito que los leucocitos pueden abandonar el torrente sanguíneo directamente atravesando el cuerpo de las células endoteliales (transcelular) [196], mayoritariamente los leucocitos transmigran abriéndose paso entre las células del endotelio (paracelular). Ambos tipos de trans migración, trans y paracelular, son reguladas por moléculas de adhesión como el CD31, el CD99, las proteínas *JAM* y la VE-cadherina. Esta última es expresada específicamente en las uniones entre las células endoteliales y juega un papel muy importante en la estabilidad endotelial estableciendo uniones homotípicas y heterofílicas que dependen de calcio [197]. Durante la migración de los leucocitos, la VE-cadherina desaparece transitoriamente de la membrana de la célula endotelial dejando un espacio a través del cual los leucocitos migran. Finalizada la migración celular, la VE-cadherina aparece rápidamente reconstituyendo las uniones endoteliales [198]. Esta regulación de la expresión de VE-cadherina se produce por fosforilación de su cola citoplasmática en respuesta a señales que se originan por el reco-

nocimiento de ICAM-1 endotelial por su ligando en neutrófilos [199]. Dado que la respuesta endotelial a los agonistas $\alpha 2$ que habíamos observado se centraba en una menor expresión de ICAM-1, junto a que las cadherinas juegan un papel muy importante en la regulación de la extravasación leucocitaria [200], decidimos estudiar el efecto de estos agonistas sobre la expresión de VE-cadherina por las células endoteliales. Mediante inmunofluorescencia y técnicas de Western blot observamos que las células endoteliales cultivadas en presencia de UK 14.304 expresaban mayor cantidad de VE-cadherina tanto en la superficie celular como en su contenido global, efecto que no ha sido descrito hasta la fecha.

Como conclusión, nuestros datos sugieren que los agonistas adrenérgicos $\alpha 2$ son capaces de modular la respuesta inflamatoria a nivel endotelial. Estos compuestos interfieren con la fase final de la cascada de adhesión al incrementar las uniones interendoteliales haciendo que el endotelio sea más resistente al paso de los leucocitos durante la respuesta inflamatoria. Estos hallazgos permiten señalar al endotelio vascular como una diana terapéutica viable para el desarrollo de agentes antiinflamatorios potencialmente útiles para el manejo de enfermedades inflamatorias en humanos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

- 1) Los PMN humanos expresan de forma constitutiva la subunidad α_{2A} de los receptores adrenérgicos y las células endoteliales la subunidad α_{2B} .
- 2) Los agonistas adrenérgicos α_2 interfieren en la acumulación de los PMN en el foco inflamatorio de modelos *in vivo*, mediante un mecanismo independiente del descenso de la temperatura corporal e inducción de apoptosis. Estos datos evidencian que los receptores adrenérgicos α_2 fuera del sistema nervioso central son capaces de modular la respuesta inflamatoria.
- 3) La estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 hace a los neutrófilos menos sensibles a la activación por citoquinas.
- 4) La activación de los receptores adrenérgico α_2 reduce la capacidad para sobreexpresar ICAM-1 en las células endoteliales en respuesta a TNF- α . Este efecto puede traducirse en una acción antiinflamatoria a nivel endotelial reduciendo la fase de adhesión firme de la cascada de adhesión.
- 5) La ocupación de los receptores adrenérgico α_2 en las células endoteliales reduce la permeabilidad del endotelio al paso tanto de iones como de macromoléculas.
- 6) El tratamiento de las HUVEC con agonistas α_2 , pero no el de PMN, impide de manera significativa la transmigración de los neutrófilos en condiciones estáticas. Estos datos demuestran que los agonistas α_2 son capaces de interferir a nivel endotelial en la extravasación de los PMN.
- 7) Los agonistas adrenérgicos α_2 aumentan la expresión de VE-cadherina en las HUVEC, interfiriendo en el proceso de extravasación de PMN. Estos datos sugieren, que el endotelio vascular puede constituir una diana terapéutica para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA:

1. Braña. M, D.r.L., Trives. C y Salazar, N. , *La verdadera historia de la Aspirina.* . An. R. Acad. Nac. Farm., 2005. **71**: p. 813-819.
2. Persky, R.S., Cisek, Cugene.P. , *La Aspirina.*, ed. E.M.R. S.A. 1995.
3. Zelenková, H., *Preparados con Ácido Glicirricínico en la práctica dermatovenerológica. Tratamiento del Acné Vulgaris. Resultados Preliminares de un Estudio Piloto sobre GRANEX.* 2005.
4. Pérez Tamayo, R., *De la medicina primitiva a la medicina científica.* FCE. 1995, México.
5. Bender, A.G., *Historia de la medicina.*, ed. P. Médica and D.y.C. de Parke. Vol. Vol. 59. 1966. pp. 133-138.
6. Nickel, D., *Did Hippocratic thinking influence Praxagoras of Kos?* Stud Anc Med. , 2005. **31**: p. 315-23.
7. Arboleya Rodríguez, L., *Manual de la SER de las Enfermedades Reumáticas.* . 5ta. ed. AINE y condroprotectores., ed. E.M. Panamerica. 2008, Madrid. 129-136.
8. ONU. *El ABC de las drogas.* . 1977. Ginebra.
9. von Andrian, U.H., et al., *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, 1991. **88**(17): p. 7538-42.
10. Cotran R, K.V., Robbins S., *Patología estructural y Funcional.* 6ª, ed. E. Interamericana. 2000, México.
11. Ferrero-Miliani, L., et al., *Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation.* Clin Exp Immunol, 2007. **147**(2): p. 227-35.
12. Botting, R.M., *Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses.* J Physiol Pharmacol, 2006. **57 Suppl 5**: p. 113-24.
13. Díaz González, F.S.-M., F., *Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs.* Immunol Today 1998. **19**: p. 169-172.
14. Willis, A.S., D., *Therapeutic impact of eicosanoids in atherosclerotic disease.* Eicosanoids, 1989. **2**: p. 69-99.
15. Robinson, D., Curran, D., Hamer, P. , *Prostaglandins and related compounds in inflammatory reumatic diseases. In Advances in inflamation rearch.* 1982, New York.
16. Lampugnani, M.G., et al., *The role of integrins in the maintenance of endothelial monolayer integrity.* J Cell Biol, 1991. **112**(3): p. 479-90.
17. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity.* Cell, 1991. **67**(6): p. 1033-6.
18. Shimizu, Y., et al., *Lymphocyte interactions with endothelial cells.* Immunol Today, 1992. **13**(3): p. 106-12.
19. Garcia-Vicuna, R., et al., *Prevention of cytokine-induced changes in leukocyte adhesion receptors by nonsteroidal antiinflammatory drugs from the oxicam family.* Arthritis Rheum, 1997. **40**(1): p. 143-53.
20. Slauson, D.C., B, *Mechanism of Disease. A textbook of Comparative General Pathology.* 1990, Maryland.
21. Guyton, A.H., J., *Tratado de Fisiología Médica.* MMVI Elsevier España, S.A. ed, ed. n. Ed. 2007, Madrid. 429-438.

22. Cutolo, M., et al., *Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 1993. **11**(3): p. 331-9.
23. Egido, J.G.-R., J. Herrero-Beaumont, G. Rodríguez de la Serna, A. , *Manual de Inflamación*, ed. E.M.M. Communications. 1999, Madrid.
24. Pascual Gómez, E.R.V., Vicente; Carbonell Abelló, Jordi; Gómez-Reino Carnota, Juan J. . *Tratado de de Reumatología*, ed. S.A. Arán Ediciones. 1998.
25. Borregaard, N., et al., *Human neutrophil granules and secretory vesicles*. Eur J Haematol, 1993. **51**(4): p. 187-98.
26. Veiga M, E.M., Ranzani-Paiva M, Rodrigues E. , *Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de salminus maxillosus valenciennes, 1840 (characiformes, characidae)*. . Rev. Chil. Anat., 2000. **vol.18, no.2**: p. 245-250.
27. Bainton, D.F., J.L. Ulliyot, and M.G. Farquhar, *The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow*. J Exp Med, 1971. **134**(4): p. 907-34.
28. López, J.A., et al., *Bernard-Soulier syndrome*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4397-418.
29. Sengelov, H., et al., *Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils*. J Immunol, 1994. **153**(2): p. 804-10.
30. Koopman W, J., *Textbook of Rheumatology*. Arthritis and allied condition. , ed. ed. 1997. 979-992
31. Edelman, G.M. and K.L. Crossin, *Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 155-90.
32. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
33. Marlin, S.D. and T.A. Springer, *Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)*. Cell, 1987. **51**(5): p. 813-9.
34. Staunton, D.E., M.L. Dustin, and T.A. Springer, *Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 61-4.
35. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 327-34.
36. Elices, M.J., et al., *VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site*. Cell, 1990. **60**(4): p. 577-84.
37. Lasky, L.A., *Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation*. Science, 1992. **258**(5084): p. 964-9.
38. Lawrence, M.B. and T.A. Springer, *Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins*. Cell, 1991. **65**(5): p. 859-73.
39. Lorant, D.E., et al., *Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils*. J Cell Biol, 1991. **115**(1): p. 223-34.
40. von Asmuth, E.J., et al., *Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2519-26.
41. Bevilacqua, M.P., *Endothelial-leukocyte adhesion molecules*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 767-804.

42. Lewinsohn, D.M., R.F. Bargatze, and E.C. Butcher, *Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes*. J Immunol, 1987. **138**(12): p. 4313-21.
43. Kishimoto, T.K., et al., *Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors*. Science, 1989. **245**(4923): p. 1238-41.
44. Humbria, A., et al., *Expression of L-selectin, CD43, and CD44 in synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint diseases. Evidence for a soluble form of L-selectin in synovial fluid*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(3): p. 342-8.
45. McEver, R.P., *Selectins*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(1): p. 75-84.
46. Foxall, C., et al., *The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide*. J Cell Biol, 1992. **117**(4): p. 895-902.
47. Luster, A.D., R. Alon, and U.H. von Andrian, *Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1182-90.
48. Schleiffenbaum, B., O. Spertini, and T.F. Tedder, *Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity*. J Cell Biol, 1992. **119**(1): p. 229-38.
49. Hafezi-Moghadam, A., et al., *L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 863-72.
50. Dana, N., et al., *Deficiency of a surface membrane glycoprotein (Mo1) in man*. J Clin Invest, 1984. **73**(1): p. 153-9.
51. Nurden, A.T. and J.P. Caen, *An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia*. Br J Haematol, 1974. **28**(2): p. 253-60.
52. Stephens, L.E., et al., *Targeted deletion of beta 1 integrins in F9 embryonal carcinoma cells affects morphological differentiation but not tissue-specific gene expression*. J Cell Biol, 1993. **123**(6 Pt 1): p. 1607-20.
53. Ingber, D.E., et al., *Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells*. J Cell Biol, 1990. **110**(5): p. 1803-11.
54. Ginsberg MH, D.-G.F., *Cell adhesion molecules and endothelial cells in arthritis*. In: Koopman WJ, editor. Arthritis and allied conditions. A textbook of Rheumatology. , 1997. **13th ed**: p. 479-489.
55. Hemler, M.E., *VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 365-400.
56. Plow, E.F., et al., *Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets*. Blood, 1985. **66**(3): p. 724-7.
57. Hernandez-Caselles, T., et al., *ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1993. **23**(11): p. 2799-806.
58. Ruegg, C., et al., *Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering*. J Cell Biol, 1992. **117**(1): p. 179-89.
59. Hickstein, D.D., A.L. Back, and S.J. Collins, *Regulation of expression of the CD11b and CD18 subunits of the neutrophil adherence receptor during human myeloid differentiation*. J Biol Chem, 1989. **264**(36): p. 21812-7.
60. Igotz, R.A. and J. Massague, *Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action*. Cell, 1987. **51**(2): p. 189-97.

61. Plantefaber, L.C. and R.O. Hynes, *Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells*. Cell, 1989. **56**(2): p. 281-90.
62. Ginsberg, M.H., et al., *Immunochemical and amino-terminal sequence comparison of two cytoadhesins indicates they contain similar or identical beta subunits and distinct alpha subunits*. J Biol Chem, 1987. **262**(12): p. 5437-40.
63. Alcaide, P., S. Auerbach, and F.W. Luscinckas, *Neutrophil recruitment under shear flow: it's all about endothelial cell rings and gaps*. Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 43-57.
64. Vestweber, D., *VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(2): p. 223-32.
65. Konstantoulaki, M., P. Kouklis, and A.B. Malik, *Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(2): p. L434-42.
66. Kurzen, H., et al., *Tightening of endothelial cell contacts: a physiologic response to cocultures with smooth-muscle-like 10T1/2 cells*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(1): p. 143-53.
67. Takeichi, M., *Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 237-52.
68. Gory-Faure, S., et al., *Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis*. Development, 1999. **126**(10): p. 2093-102.
69. von Andrian, U.H., et al., *L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways*. Blood, 1993. **82**(1): p. 182-91.
70. Korn, E.D., *Cell membranes: structure and synthesis*. Annu Rev Biochem, 1969. **38**: p. 263-88.
71. Cohnheim, J., *Lectures on General Pathology*, in *A Handbook for Practitioners and Students*. 1889, The New Sydenham Society.: London.
72. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
73. Rivera-Nieves, J., G. Gofu, and K. Ley, *Leukocyte adhesion molecules in animal models of inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(12): p. 1715-35.
74. Harris E, B.R.C., Firestein Gary S. Genovese Mark C, Sergeant John S, Ruddy Shaun, Sledge Clement B. , *Kelley's textbook of rheumatology.*, ed. S. Edition. Vol. Volumen I. 2005.
75. Barreiro, O. and F. Sanchez-Madrid, *Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response*. Rev Esp Cardiol, 2009. **62**(5): p. 552-62.
76. Cinamon, G., V. Shinder, and R. Alon, *Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(6): p. 515-22.
77. Finger, E.B., et al., *A differential role for cell shape in neutrophil tethering and rolling on endothelial selectins under flow*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 5085-96.
78. Jung, U., et al., *Velocity differences between L- and P-selectin-dependent neutrophil rolling in venules of mouse cremaster muscle in vivo*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 2): p. H2740-7.

79. Kansas, G.S. and F.M. Pavalko, *The cytoplasmic domains of E- and P-selectin do not constitutively interact with alpha-actinin and are not essential for leukocyte adhesion*. J Immunol, 1996. **157**(1): p. 321-5.
80. Diamond, M.S., et al., *Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation*. Cell, 1991. **65**(6): p. 961-71.
81. Oppenheimer-Marks, N. and M. Ziff, *Migration of lymphocytes through endothelial cell monolayers: augmentation by interferon-gamma*. Cell Immunol, 1988. **114**(2): p. 307-23.
82. Bokoch, G.M., *Chemoattractant signaling and leukocyte activation*. Blood, 1995. **86**(5): p. 1649-60.
83. Yadav, R., et al., *Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond*. Thromb Haemost, 2003. **90**(4): p. 598-606.
84. Schenkel, A.R., et al., *CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 143-50.
85. Muller, W.A., et al., *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 449-60.
86. Barcroft, H. and J.F. Talbot, *Oliver and Schafer's discovery of the cardiovascular action of suprarenal extract*. Postgrad Med J, 1968. **44**(507): p. 6-8.
87. Civantos Calzada, B. and A. Aleixandre de Artinano, *Alpha-adrenoceptor subtypes*. Pharmacol Res, 2001. **44**(3): p. 195-208.
88. Docherty, J.R., *Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors*. Eur J Pharmacol, 1998. **361**(1): p. 1-15.
89. Ferrer-Lorente, R., et al., *Combined effects of oleoyl-estrone and a beta3-adrenergic agonist (CL316,243) on lipid stores of diet-induced overweight male Wistar rats*. Life Sci, 2005. **77**(16): p. 2051-8.
90. Kable, J.W., L.C. Murrin, and D.B. Bylund, *In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **293**(1): p. 1-7.
91. Riedl, M.S., et al., *Coexpression of alpha 2A-adrenergic and delta-opioid receptors in substance P-containing terminals in rat dorsal horn*. J Comp Neurol, 2009. **513**(4): p. 385-98.
92. Philipp, M.B., M. Hein, L., *Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(2): p. R287-95.
93. Elenkov, I.J., et al., *The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 595-638.
94. Brede, M., et al., *alpha2-adrenergic receptor subtypes - novel functions uncovered in gene-targeted mouse models*. Biol Cell, 2004. **96**(5): p. 343-8.
95. Philipp, M., et al., *Placental alpha(2)-adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo*. Nat Genet, 2002. **31**(3): p. 311-5.
96. Motulsky, H.J. and P.A. Insel, *Adrenergic receptors in man: direct identification, physiologic regulation, and clinical alterations*. N Engl J Med, 1982. **307**(1): p. 18-29.
97. Salminen, T., et al., *Three-dimensional models of alpha(2A)-adrenergic receptor complexes provide a structural explanation for ligand binding*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23405-13.

98. Magnin, T., et al., *A novel, generic and effective method for the rapid purification of G protein-coupled receptors*. Protein Expr Purif, 2008.
99. Small, K.M. and S.B. Liggett, *Identification and functional characterization of alpha(2)-adrenoceptor polymorphisms*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(9): p. 471-7.
100. Cooper, M., *La Célula.*, ed. Ed.Marbán. 2006.
101. Limbird, L.E., *Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms*. FASEB J, 1988. **2**(11): p. 2686-95.
102. Small, K.M., et al., *Alpha2A- and alpha2C-adrenergic receptors form homo- and heterodimers: the heterodimeric state impairs agonist-promoted GRK phosphorylation and beta-arrestin recruitment*. Biochemistry, 2006. **45**(15): p. 4760-7.
103. Wang, Q. and L.E. Limbird, *Regulation of alpha2AR trafficking and signaling by interacting proteins*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(8): p. 1135-45.
104. Nyronen, T., et al., *Molecular mechanism for agonist-promoted alpha(2A)-adrenoceptor activation by norepinephrine and epinephrine*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(5): p. 1343-54.
105. Chang, L.C., et al., *Expression of adenylyl cyclase isoforms in neutrophils*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1640**(1): p. 53-60.
106. Peltonen, J.M., et al., *Molecular mechanisms of ligand-receptor interactions in transmembrane domain V of the alpha2A-adrenoceptor*. Br J Pharmacol, 2003. **140**(2): p. 347-58.
107. Keledjian, K., J.B. Garrison, and N. Kyprianou, *Doxazosin inhibits human vascular endothelial cell adhesion, migration, and invasion*. J Cell Biochem, 2005. **94**(2): p. 374-88.
108. Panosian, J.O. and G.V. Marinetti, *alpha 2-Adrenergic receptors in human polymorphonuclear leukocyte membranes*. Biochem Pharmacol, 1983. **32**(14): p. 2243-7.
109. Nishina, K., et al., *The effects of clonidine and dexmedetomidine on human neutrophil functions*. Anesth Analg, 1999. **88**(2): p. 452-8.
110. Kishikawa, H., et al., *The effects of dexmedetomidine on human neutrophil apoptosis*. Biomed Res, 2008. **29**(4): p. 189-94.
111. Casale, T.B. and M. Kaliner, *Demonstration that circulating human blood cells have no detectable alpha 1-adrenergic receptors by radioligand binding analysis*. J Allergy Clin Immunol, 1984. **74**(6): p. 812-8.
112. Musgrave, I.F. and R. Seifert, *Human neutrophils and HL-60 cells do not possess alpha 2-adrenoceptors*. Biochem Pharmacol, 1994. **47**(2): p. 233-9.
113. Sved, A.F., K. Tsukamoto, and A.M. Schreihofner, *Stimulation of alpha 2-adrenergic receptors in nucleus tractus solitarius is required for the baroreceptor reflex*. Brain Res, 1992. **576**(2): p. 297-303.
114. Wang, R.X. and L.E. Limbird, *Distribution of mRNA encoding three alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the developing mouse embryo suggests a role for the alpha 2A subtype in apoptosis*. Mol Pharmacol, 1997. **52**(6): p. 1071-80.
115. Majid Malekzadeh Shafaroudi, M.M., 1 Clare Deighan, Alexis Wokoma, and C.J.D. Joyce Macmillan, and John C. McGrath, *Two "knockout" mouse models demonstrate that aortic vasodilatation is mediated via 2A-adrenoceptors located on the endothelium*. THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 2005. **314**: p. 804-810.

116. Flavahan, N.A., *Phenylpropanolamine constricts mouse and human blood vessels by preferentially activating alpha2-adrenoceptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(1): p. 432-9.
117. Bhattacharya, B., et al., *Role of cytosolic phospholipase A2 in the enhancement of alpha2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction by the thromboxane-mimetic U46619 in the porcine isolated ear artery: comparison with vasopressin-enhanced responses*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(8): p. 1200-10.
118. Seya, Y., et al., *Effect of norepinephrine on RhoA, MAP kinase, proliferation and VEGF expression in human umbilical vein endothelial cells*. Eur J Pharmacol, 2006. **553**(1-3): p. 54-60.
119. Abraham, E., D.J. Kaneko, and R. Shenkar, *Effects of endogenous and exogenous catecholamines on LPS-induced neutrophil trafficking and activation*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 1): p. L1-8.
120. R. Lu, Y.C., C. Cottingham, N. Peng, K. Jiao, L. E. Limbird, J. M. Wyss and Q. Wang, *Enhanced Hypotensive, Bradycardia and Hypnotic Responses to alpha2-adrenergic Agonists in Spinophilin Null Mice Are Accompanied by Increased G Protein Coupling to the alpha2AAR*. Molecular Pharmacology, 2010.
121. Slough, S., G. Guillaumet, and P.V. Taberner, *Evidence that the novel imidazoline compound FT005 is an alpha(2)-adrenoceptor agonist*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(7): p. 1049-57.
122. Bo XU, W.-s.Z., Jia-le YANG, Hua XU, Xiao-ming DENG, *, Yu-qiu ZHANG., *Dexmedetomidine blocks thermal hyperalgesia and spinal glial activation in rat model of monoarthritis*. Acta Pharmacologica Sinica, 2010. **1-8**.
123. Marrs, W., et al., *Alpha-2 adrenoceptor activation inhibits phencyclidine-induced deficits of spatial working memory in rats*. Neuropsychopharmacology, 2005. **30**(8): p. 1500-10.
124. Eisenach, J.C., M. De Kock, and W. Klimscha, *alpha(2)-adrenergic agonists for regional anesthesia. A clinical review of clonidine (1984-1995)*. Anesthesiology, 1996. **85**(3): p. 655-74.
125. Hunter JC;Fontana, D.J., et al., *Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice*. Br J Pharmacol, 1997. **122**(7): p. 1339-44.
126. Willems, E.W., et al., *Possible role of alpha-adrenoceptor subtypes in acute migraine therapy*. Cephalalgia, 2003. **23**(4): p. 245-57.
127. Wilder, R.L., *Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 307-38.
128. Tracey, K.J., *The inflammatory reflex*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 853-9.
129. Bylund, D.B., *Subtypes of alpha 2-adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge*. Trends Pharmacol Sci, 1988. **9**(10): p. 356-61.
130. Liao, J.K. and C.J. Homey, *The release of endothelium-derived relaxing factor via alpha 2-adrenergic receptor activation is specifically mediated by Gi alpha 2*. J Biol Chem, 1993. **268**(26): p. 19528-33.
131. Derian, C.K., et al., *Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 308-17.

132. Pauwels, R.A., et al., *Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group*. N Engl J Med, 1997. **337**(20): p. 1405-11.
133. Straub, R.H., et al., *Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro*. Faseb J, 2002. **16**(9): p. 993-1000.
134. Schramm, C.M., *beta-adrenergic relaxation of rabbit tracheal smooth muscle: a receptor deficit that improves with corticosteroid administration*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(1): p. 280-7.
135. Flierl, M.A., et al., *Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4414.
136. Horn, N.A., et al., *Epinephrine enhances platelet-neutrophil adhesion in whole blood in vitro*. Anesth Analg, 2005. **100**(2): p. 520-6.
137. Suleyman, H., et al., *Relation of adrenergic receptors, which have roles in gastroprotective and anti-inflammatory effect of adrenal gland hormones, with cyclooxygenase enzyme levels in rats*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60**(4): p. 129-34.
138. Committee to Update Science, M., and Animals, and N.R. Council, *Science, Medicine, and Animals*. 2004.
139. Kucharewicz, I., A. Bodzenta-Lukaszyk, and W. Buczko, *Experimental asthma in rats*. Pharmacol Rep, 2008. **60**(6): p. 783-8.
140. Edwards, J.C., A.D. Sedgwick, and D.A. Willoughby, *The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system*. J Pathol, 1981. **134**(2): p. 147-56.
141. Pessler, F., et al., *Identification of novel monosodium urate crystal regulated mRNAs by transcript profiling of dissected murine air pouch membranes*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(3): p. R64.
142. Duncan, G.S., et al., *Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 3022-30.
143. Seidman, M.A., et al., *PECAM-independent thioglycollate peritonitis is associated with a locus on murine chromosome 2*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4316.
144. Sharar, S.R., et al., *L-selectin (CD62L) blockade does not impair peritoneal neutrophil emigration or subcutaneous host defense to bacteria in rabbits*. J Immunol, 1996. **157**(6): p. 2555-63.
145. Moon, C., et al., *Synthetic RGDS peptide attenuates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation by inhibiting integrin signaled MAP kinase pathways*. Respir Res, 2009. **10**: p. 18.
146. Mitchell, K., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in the choroid plexus: a potential link between vascular pro-inflammatory mediators and the CNS during peripheral tissue inflammation*. Neuroscience, 2009. **158**(2): p. 885-95.
147. Strober, W., I.J. Fuss, and R.S. Blumberg, *The immunology of mucosal models of inflammation*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 495-549.
148. Balfour Sartor, R., H.R., Steven Lichtman, Eric Van Tol, *Animal models of intestinal and joint inflammation*. Bailliere's Clinical Rheumatology, 1996. **10**: p. 55-76.

149. Chung, H.J., et al., *Modulation of acute and chronic inflammatory processes by a traditional medicine preparation GCSB-5 both in vitro and in vivo animal models*. J Ethnopharmacol. **130**(3): p. 450-9.
150. Karol, M.H., *Animal models of occupational asthma*. Eur Respir J, 1994. **7**(3): p. 555-68.
151. Gómez-Gavira, M.V., et al., *Down-regulation of L-selectin expression in neutrophils by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: role of intracellular ATP concentration*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3592-600.
152. Kwon, Y.B., et al., *The anti-inflammatory effect of bee venom stimulation in a mouse air pouch model is mediated by adrenal medullary activity*. J Neuroendocrinol, 2003. **15**(1): p. 93-6.
153. McCarty, D.J., Jr. and J.S. Faires, *A comparison of the duration of local anti-inflammatory effect of several adrenocorticosteroid esters--a bioassay technique*. Curr Ther Res Clin Exp, 1963. **5**: p. 284-90.
154. Kang, S.Y., et al., *The anti-arthritis effect of ursolic acid on zymosan-induced acute inflammation and adjuvant-induced chronic arthritis models*. J Pharm Pharmacol, 2008. **60**(10): p. 1347-54.
155. Melnicoff, M.J., P.K. Horan, and P.S. Morahan, *Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation*. Cell Immunol, 1989. **118**(1): p. 178-91.
156. Chan, J., et al., *Macrophage lineage cells in inflammation: characterization by colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptor (c-Fms), ER-MP58, and ER-MP20 (Ly-6C) expression*. Blood, 1998. **92**(4): p. 1423-31.
157. Cook, A.D., E.L. Braine, and J.A. Hamilton, *The phenotype of inflammatory macrophages is stimulus dependent: implications for the nature of the inflammatory response*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4816-23.
158. Burns, A.R., et al., *Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners*. J Immunol, 1997. **159**(6): p. 2893-903.
159. Burns, A.R., et al., *Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 1): p. 45-57.
160. McGettrick, H.M., et al., *Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 779-88.
161. Vouret-Craviari, V., et al., *Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(9): p. 2639-53.
162. Krone, W., D. Muller-Wieland, and H. Greten, *Effects of adrenergic antihypertensive drugs on sterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes*. J Cardiovasc Pharmacol, 1985. **7**(6): p. 1134-7.
163. Deupree, J.D., W.J. Burke, and D.B. Bylund, *Alpha-2 adrenergic-induced changes in rectal temperature in adult and 13-day old rats following acute and repeated desipramine administration*. BMC Pharmacol, 2008. **8**: p. 17.
164. Jung, U., et al., *Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo*. J Clin Invest, 1998. **102**(8): p. 1526-33.
165. Lacal, P., et al., *Intracellular localization of a leukocyte adhesion glycoprotein family in the tertiary granules of human neutrophils*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **154**(2): p. 641-7.

166. Diamond, M.S. and T.A. Springer, *A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen*. J Cell Biol, 1993. **120**(2): p. 545-56.
167. Dustin, M.L., et al., *Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)*. J Immunol, 1986. **137**(1): p. 245-54.
168. Springer, T.A., *Adhesion receptors of the immune system*. Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-34.
169. Carlos, T.M., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells*. Blood, 1990. **76**(5): p. 965-70.
170. Osborn, L., et al., *Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes*. Cell, 1989. **59**(6): p. 1203-11.
171. Barclay, A.N., et al., *The leukocyte-common antigen (L-CA) family*. Adv Exp Med Biol, 1988. **237**: p. 3-7.
172. Benedetto, N., et al., *Effects of alpha-adrenergic agonists on Toxoplasma gondii replication in human umbilical vein endothelial cells*. Pathol Biol (Paris), 1997. **45**(1): p. 9-18.
173. Filep, J.G. and D. El Kebir, *Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation*. J Cell Biochem, 2009. **108**(5): p. 1039-46.
174. Dejana, E., F. Orsenigo, and M.G. Lampugnani, *The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 13): p. 2115-22.
175. Schenkel, A.R., T.W. Chew, and W.A. Muller, *Platelet endothelial cell adhesion molecule deficiency or blockade significantly reduces leukocyte emigration in a majority of mouse strains*. J Immunol, 2004. **173**(10): p. 6403-8.
176. Philipp, M., M. Brede, and L. Hein, *Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(2): p. R287-95.
177. McCune, S.K., M.M. Voigt, and J.M. Hill, *Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain*. Neuroscience, 1993. **57**(1): p. 143-51.
178. Nicholas, A.P., T. Hokfelt, and V.A. Pieribone, *The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization*. Trends Pharmacol Sci, 1996. **17**(7): p. 245-55.
179. Blaxall, H.S., N.A. Hass, and D.B. Bylund, *Expression of alpha 2-adrenergic receptor genes in rat tissues*. Receptor, 1994. **4**(3): p. 191-9.
180. Gyires, K., et al., *Analysis of the role of central and peripheral alpha2-adrenoceptor subtypes in gastric mucosal defense in the rat*. Neurochem Int, 2007. **51**(5): p. 289-96.
181. Angus, J.A., T.M. Cocks, and K. Satoh, *The alpha adrenoceptors on endothelial cells*. Fed Proc, 1986. **45**(9): p. 2355-9.
182. Vanhoutte, P.M. and V.M. Miller, *Alpha 2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor*. Am J Med, 1989. **87**(3C): p. 1S-5S.
183. Bockman, C.S., I. Gonzalez-Cabrera, and P.W. Abel, *Alpha-2 adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **278**(3): p. 1235-43.

184. Spengler, R.N., et al., *Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor*. J Immunol, 1990. **145**(5): p. 1430-4.
185. Titinchi, S. and B. Clark, *Alpha 2-adrenoceptors in human lymphocytes: direct characterisation by [3H]yohimbine binding*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **121**(1): p. 1-7.
186. Felsner, P., et al., *Adrenergic suppression of peripheral blood T cell reactivity in the rat is due to activation of peripheral alpha 2-receptors*. J Neuroimmunol, 1995. **57**(1-2): p. 27-34.
187. Maes, M., et al., *The effects of noradrenaline and alpha-2 adrenoceptor agents on the production of monocytic products*. Psychiatry Res, 2000. **96**(3): p. 245-53.
188. Michel, M.C., et al., *Alpha 2-adrenergic receptor stimulation mobilizes intracellular Ca²⁺ in human erythroleukemia cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(9): p. 4986-91.
189. Siess, W. and E.G. Lapetina, *Platelet aggregation induced by alpha 2-adrenoceptor and protein kinase C activation. A novel synergism*. Biochem J, 1989. **263**(2): p. 377-85.
190. Zhao, Z., W.E. Code, and L. Hertz, *Dexmedetomidine, a potent and highly specific alpha 2 agonist, evokes cytosolic calcium surge in astrocytes but not in neurons*. Neuropharmacology, 1992. **31**(10): p. 1077-9.
191. Yoon, S.Y., et al., *Intrathecal clonidine suppresses zymosan-induced peripheral leukocyte migration in a mouse air pouch model via activation of spinal muscarinic type 2 receptors and sympathoadrenal medullary activity*. Neuropharmacology, 2006. **51**(4): p. 829-37.
192. Sallinen, J., et al., *Genetic alteration of alpha 2C-adrenoceptor expression in mice: influence on locomotor, hypothermic, and neurochemical effects of dexmedetomidine, a subtype-nonselective alpha 2-adrenoceptor agonist*. Mol Pharmacol, 1997. **51**(1): p. 36-46.
193. Garrido-Urbani, S., et al., *Vascular and epithelial junctions: a barrier for leukocyte migration*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 2): p. 203-11.
194. Zeilhofer, H.U. and W. Schorr, *Role of interleukin-8 in neutrophil signaling*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(3): p. 178-82.
195. Kimoto, T., et al., *Effect of adrenergic stimulation on drug absorption via passive diffusion in Caco-2 cells*. Int J Pharm, 2009. **368**(1-2): p. 31-6.
196. Feng, D., et al., *Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP*. J Exp Med, 1998. **187**(6): p. 903-15.
197. Lampugnani, M.G., et al., *A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts*. J Cell Biol, 1992. **118**(6): p. 1511-22.
198. Shaw, S.K., et al., *Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2323-30.
199. Allingham, M.J., J.D. van Buul, and K. Burridge, *ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 4053-64.
200. Vestweber, D., *Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium*. Immunol Rev, 2007. **218**: p. 178-96.