

11261

2

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado e Investigación



***Capacidad Catalítica de las Células Epiteliales
Corneales sobre el Plasminógeno y
Producción de Angiostatina***

T E S I S
para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias
P r e s e n t a
Everardo Hernández Quintela

México, D.F.

2001





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

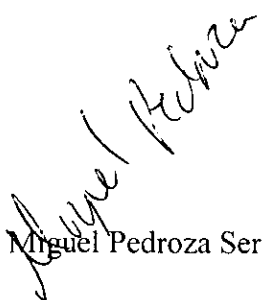
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A Bertha,
por iluminar cada día con su sonrisa
y traer a Valeria.

A Valeria,
razón de mucho y por su cariño.

A Everardo y Gloria[†],
porque estoy aquí.

A David, Saida e Ivan,
porque siempre han creído en mí.



Dr. Miguel Pedroza Seres
Tutor Académico

Universidad Nacional Autónoma de México

Indice

<i>Agradecimientos</i>	6
<i>Resumen</i>	7
<i>Abstract</i>	8
INTRODUCCION	9
Antecedentes	9
Modelo de Homeostasis.....	9
Mecanismo de Angiogénesis	10
Investigación de la Angiogénesis	10
Hipótesis “Los tumores son dependientes de la angiogénesis”	11
Factores de crecimiento angiogénicos	11
Inhibición de la angiogénesis	13
Producción enzimática de angiostatina a partir de plasminógeno	14
Planteamiento del Problema	15
<i>Justificación</i>	16
<i>Hipótesis</i>	16
<i>Objetivo</i>	16
Metas	16
<i>Material y Métodos</i>	18
Animales.....	18
Obtención del Epitelio Corneal	18

Fases e Incubaciones	19
Electrotransferencia	20
Resultados	22
Primera fase	22
Segunda fase	22
Tercera fase.....	23
Discusión	25
Digestión de Plasminógeno por el Epitelio Corneal.....	25
Producción de Angiostatina por las Células del Epitelio Corneal.....	26
Papel de las MMPs en la Degradación del Plasminógeno y producción de Angiostatina	29
Incubaciones con ϵ -ACA y el papel potencial de la plasmina.....	30
Conclusiones	32
Referencias	33
Tablas y figuras	42
Abreviaturas	57

La parte experimental de este proyecto de investigación, fundamento de la presente Tesis de Maestría, se realizó en el Departamento de Oftalmología, de Harvard Medical School y el Schepens Eye Research Institute, Boston, Massachusetts, E.U.A. En el desarrollo del mismo, participaron como asesores el Dr. Dimitri T. Azar, Director de los Servicios de Córnea y Cirugía Refractiva del Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School y el Dr. Miguel Pedroza Seres, asesor académico de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo proporcionado durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Ramón Naranjo Tackman, al Dr. Rafael Sánchez Fontán y al Hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes” de la Asociación para Evitar la Ceguera en México por la oportunidad de participar en el programa de Maestría y Doctorado de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como su apoyo económico.

Al Dr. Dimitri T. Azar por la oportunidad de trabajar con él, por recibirnos, a mí y a mi familia, de forma tan cálida.

A mis otros maestros: al Dr. Yves Pouliquen, quien me enseñó el abordaje humano a nuestros pacientes y su trato extraordinario. Al Dr. Jean-Marc Legeais, por la oportunidad de compartir su practica profesional y su introducción al mundo de la comunicación escrita.

Al Dr. Diego Cuevas Cancino, por sus consejos de hombre sabio.

A la Fundación UNAM. A la Fundación Miguel Alemán. A los Laboratorios Sophia, S.A. de C.V y a todos aquellos que, de alguna manera, me acompañaron en este proyecto.

Resumen

Objetivo: Determinar mediante un sistema *in vitro* la capacidad catalítica de las células epiteliales de la córnea del ratón, sobre plasminógeno humano y la producción de angiostatina.

Material y Métodos: Se utilizó el epitelio de los 3 mm centrales de la córnea, de 30 ratones silvestres cepa C57BL/6J, cuatro ratones transgénicos para metaloproteasa (MMP) -7 y cuatro para MMP-12. El epitelio fue incubado con plasminógeno humano durante 0, 6, 12, 24 y 48 h en una solución de PO_4 50 mM, pH 7.4 a 37°C. En otro experimento, se incubaron muestras de epitelio corneal de ratón silvestre durante 48 h con diferentes concentraciones de inhibidores de proteasas: inhibidor sintéticos de metaloproteasas (SIMP) y ϵ -ácido-amino-caproico (ϵ -ACA). Se analizaron por electrotransferencia utilizando un anticuerpo policlonal anti-K1-3 del plasminógeno y revelado con un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina.

Resultados: el plasminógeno disminuyó conforme aumentó el tiempo de incubación con células epiteliales de ratones silvestres y transgénicos para MMP-7 y -12. Los niveles de angiostatina se mantuvieron constantes a través del tiempo. El SIMP no tuvo efecto sobre la degradación de plasminógeno, sin embargo, disminuyó las fracciones de angiostatina al aumentar su concentración. Las incubaciones de epitelio corneal de ratones silvestres con plasminógeno humano adicionando ϵ -ACA, aumentó las fracciones de plasminógeno y angiostatina conforme aumentó la concentración de ϵ -ACA. Conclusiones: Las células epiteliales de ratones silvestres, transgénicos para MMP-7 y MMP-12 son capaces de degradar el plasminógeno y mantener niveles constantes de angiostatina a través del tiempo en incubaciones *in vitro*.

Abstract

Objective: to determine the cleavage capacity of corneal epithelial cells of wild type, metalloproteinase (MMP) -7 and -12 knock out (KO) mice over plasminogen and production of angiostatin.

Methods: The corneal epithelium of the right eyes of 30 wild type (WT), 4 MMP-7 and four -12 knock out mice were incubated with human plasminogen at different time points (6, 12, 24, and 48 h) in a solution of PO_4 50 mM, pH 7.4 at 37°C. In other sets of experiments, inhibitors of proteases were added at different concentrations and incubated with corneal epithelial cells from wild type mice. Analysis was made through Western Blot using a polyclonal anti-K1-3 plasminogen antibody and developed with an alkaline phosphatase-conjugated antibody.

Results: Western Blot analysis revealed a progressive degradation of plasminogen through time (0, 6, 12, 24 48 h) when incubated with corneal epithelial cells. In contrast, plasminogen was not degraded when incubated alone for 48 h. The levels of angiostatin were constant at all times. The degradation of plasminogen and the levels of angiostatin of corneal epithelial cells of KO-MMP-7 and KO-MMP-12 mice incubated with plasminogen did not differ from those observed with corneal epithelial cells from WT mice. The degradation of plasminogen was not altered by SIMP. Angiostatin levels were reduced by SIMP in a concentration dependent manner. The degradation of plasminogen and angiostatin was reduced in a dose dependent manner when corneal epithelium of WT mice was incubated with ϵ -ACA.

Conclusions: Corneal epithelial cells harbor enzymatic activity that results in plasminogen degradation and angiostatin production.

INTRODUCCION

Antecedentes

Modelo de Homeostasis

El término angiogénesis fue introducido en 1935 para describir la formación de nuevos vasos sanguíneos en la placenta.[1] Las células endoteliales vasculares normales están rodeadas de estímulos angiogénicos que incluyen factores de crecimiento y prostaglandinas por un estímulo inflamatorio local. Está comprobado, que el estado de vascularidad normal de los tejidos refleja un balance complejo y preciso de los mediadores endógenos pro- y anti-angiogénicos, un concepto llamado modelo de homeostasis de la angiogénesis.[2] La pérdida de este balance en favor de la neovascularización predomina en varias entidades patológicas. Por ejemplo, en las neoplasias, para que inicie la neovascularización, es necesario que disminuyan los inhibidores de la angiogénesis y a su vez, que aumente la expresión de factores de crecimiento. Algunas de las patologías con pérdida del balance en el sistema de regulación angiogénico incluyen al gen recientemente descrito de la enfermedad de von Hippel-Lindau, la cual resulta de un aumento en la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).[3] En la distrofia de fondo de Sorsby, entidad heredada en forma dominante y caracterizada por una degeneración disciforme en el área macular, depósitos de lípidos en la membrana de Bruch y membranas neovasculares coroideas, una mutación en el cromosoma 13 conduce a una pérdida de un inhibidor de la angiogénesis: el inhibidor tisular de metaloproteasa-3 [4]. Este concepto de homeostasis angiogénica en el ojo y la falta de regulación consecuente, ha tenido un valor operacional importante en la comprensión de los mecanismos que determinan la angiogénesis ocular.

En 1949, Cogan[2] propuso que la falta de crecimiento vascular en la córnea sana era atribuible al medio intersticial, ya que el estroma es compacto, ambos factores previenen la invasión vascular de la córnea.

Mecanismo de Angiogénesis

Existen tres modelos de angiogénesis hasta ahora descritos: ramaje; de crecimiento microvascular intususceptivo (no-ramaje) y de reclutamiento y diferenciación de células madre primordiales. La angiogénesis por ramaje se caracteriza por la liberación local de factores angiogénicos, que dan lugar a la activación de células endoteliales vasculares; la proteólisis de la membrana basal subyacente resulta de la producción endotelial del activador de plasminógeno y otras enzimas que permiten a las células endoteliales migrar y proliferar formando un nuevo vaso sanguíneo.[5] En la intususcepción, una evaginación de las células vasculares endoteliales se acompaña de la formación de una columna de la matriz extracelular, la cual puede prevenir el colapso de la red vascular después de que el flujo termina.[6] Muy probablemente este es uno de los modelos que participan en la neovascularización corneal. En el tercer mecanismo, las células madre primordiales se diferencian en angioblastos y a partir de la periferia son reclutados en zonas de hipoxia, en donde sufren dicha diferenciación para convertirse en células endoteliales vasculares.[7]

Investigación de la Angiogénesis

La investigación de la angiogénesis ha tenido grandes avances en el área de las neoplasias. En la investigación inicial de la vascularización tumoral, existió durante dos décadas una gran controversia entre sí los vasos que llegaban a dicha masa ya existían o se formaban de *novo*. De aquellos que favorecían la teoría de neovascularización, sugirieron que las células tumorales proliferantes inducían el crecimiento de nuevos capilares sanguíneos.[1]

Hipótesis “Los tumores son dependientes de la angiogénesis”

En estudios iniciales, se observó que los tumores implantados en órganos aislados por perfusión, crecieron pocos milímetros.[1] Sin embargo, cuando se reimplantaron en un modelo animal en ratones, los tumores crecieron sobrepasando 1 cm³ con invasión letal para el huésped. En los ratones los tumores se vascularizaron, a diferencia de lo que se observó en el modelo de órgano aislado donde no se vascularizaron.[1, 8] El endotelio capilar en estos órganos aislados en el modelo animal de ratón se degeneraba gradualmente después de una perfusión prolongada.[9]

Sobre la base de estos estudios se formularon las siguientes hipótesis: “los tumores sólidos son dependientes de la angiogénesis” y “la anti-angiogénesis podría ser una alternativa terapéutica”. [10]

Estas hipótesis fueron apoyadas en cuanto las células tumorales fueron separadas de su lecho vascular para prevenir la neovascularización. Los tumores detuvieron su crecimiento, pero volvieron al proceso de crecimiento activo en cuanto la vascularización se restableció.[9]

Factores de crecimiento angiogénicos

Por lo menos se conocen 15 factores de crecimiento angiogénicos (Tabla 1).[2, 11-34] El primer factor angiogénico, el factor de crecimiento básico de fibroblasto (bFGF), fue purificado del condrosarcoma de la rata. Este factor se ha observado en la membrana basal de córneas bovinas normales,[35] en la lágrima, y en algunas entidades oftalmológicas como el pterigión, en el vítreo de paciente con diabetes, y en membranas neovasculares de la retina y la coroides.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), se ha encontrado en mayor concentración en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa comparados con los controles.[36] A pesar del mayor conocimiento del papel del VEGF en enfermedades dependientes de la angiogénesis, los nuevos estudios sugieren que son múltiples los factores involucrados en la angiogénesis patológica. Las células endoteliales de los vasos han sido observadas por inmunohistoquímica a través de la identificación de la molécula de adhesión celular endotelial-plaquetas (PECAM-1/CD31) y endoglina (CD105). Dichas moléculas han permitido estudiar el desarrollo y la permeabilidad de los vasos en neoplasias.[37]

Los factores de crecimiento endoteliales ligados a heparina consisten de polipéptidos aniónicos con un punto isoeléctrico de 5 a 7 y un peso molecular de 15 a 18 kDa. Este tipo de factores de crecimiento se han encontrado principalmente en el sistema nervioso central e incluye al FGF ácido (aFGF), y al VEGF.[38, 39] Otra clase de factores de crecimiento celulares consisten de polipéptidos catiónicos con un punto isoeléctrico de 8 a 10 y un peso molecular de 16 a 18.5 kDa. Los receptores para aFGF/VEGF tienen un peso molecular entre 130 y 150 kDa y han sido identificados en células capilares endoteliales. Los receptores del bFGF tienen un peso molecular de 125 a 145 kDa. Ambos factores de crecimiento estimulan la proliferación endotelial *in vitro* a una concentración de 1 a 10 ng/ml. Sus propiedades angiogénicas también se han observado *in vivo*.

La angiogenina es un polipéptido con un peso molecular de 14.4 kDa. Este es un agente angiogénico muy potente.[40] La importancia de la angiogénesis, o de la formación de nuevos vasos sanguíneos, esta bien reconocida en una variedad de procesos patológicos, de reacciones inflamatorias, de reacciones de rechazo, en la respuesta de hipersensibilidad

retardada y en el crecimiento tumoral.[41] Hasta el momento el conocimiento de los mecanismos por medio de los cuales se induce la neovascularización es limitado.[42]

Inhibición de la angiogénesis

Las señales que promueven la angiogénesis son reguladas, en el tejido sano, por la presencia de inhibidores endógenos de la neovascularización. Una docena de moléculas sintéticas y naturales han sido reportadas con propiedades anti-angiogénicas (Tabla 1). Actualmente se están probando 20 medicamentos en ensayos clínicos humanos, principalmente en el área del cáncer y en pacientes con degeneración macular relacionada con la edad. Esta terapia[8] fue diseñada para revertir a su estado normal a las células vasculares endoteliales proliferantes.

Las células involucradas en la anti-angiogénesis son el pericito[43] y el macrófago.[44] El macrófago es también capaz de producir factores angiogénicos como el bFGF. Dong y cols. [44] han demostrado que los macrófagos que invaden el carcinoma de pulmón de Lewis pueden producir metaloelastasa. Esta enzima genera un inhibidor de la angiogénesis, la angiostatina. Esta es una proteína con un peso molecular de 58 kDa producto de la degradación del plasminógeno. La actividad de la angiostatina es específica para inhibir la proliferación endotelial. La angiostatina puede suprimir las metástasis así como inducir la regresión de los carcinomas de mama, próstata y colon.[45] En el ratón, la administración sistémica de angiostatina ha demostrado inhibir la neovascularización corneal sin toxicidad agregada.[46] El mecanismo por el cual la angiostatina disminuye la actividad vascular endotelial parece ser a través de apoptosis y de la activación de adhesión focal de una cinasa.[47] Entre otros inhibidores de la angiogénesis se encuentra la endostatina, un fragmento de 18 kDa de la colágena tipo XVIII.

Producción enzimática de angiostatina a partir de plasminógeno

La angiostatina ha demostrado tener un papel en el mantenimiento de la transparencia corneal, al impedir el crecimiento de vasos sanguíneos en la córnea. La angiostatina inhibe la vascularización corneal inducida por VEGF en el ratón.[48] En nuestro laboratorio, hemos realizado experimentos que muestran que al neutralizar la angiostatina con anticuerpos específicos, se logra inducir la vascularización de la córnea después de 36 h de fotoablación, mientras que la neutralización de la cadena B del plasminógeno tuvo un efecto significativamente menor.[49] Varios estudios *in vitro*, han demostrado que la degradación enzimática del plasminógeno catalizada por las metaloproteasas (MMPs) -2, -7, -9 y -12 [44, 50], la plasmina[51] y la elastasa pancreática[46, 48, 52] genera angiostatina. Estos hallazgos sugieren un papel potencial de las MMPs en la producción de angiostatina *in vivo* y en el mantenimiento de la falta de vasos sanguíneos en la cornea.

El plasminógeno es una proteína de dos cadenas, A y B; la cadena A incluye 5 dominios. El N-terminal de la angiostatina corresponde al residuo 97 del plasminógeno, y el C-terminal está localizado entre el dominio 3 y 5, dependiendo de la enzima que actúe sobre el plasminógeno.[44] El peso molecular de la angiostatina es de 58 kDa.[50] O'Reilly[45] reportó que la angiostatina estaba compuesta de los primeros 3 dominios del plasminógeno y que es generada por elastasa pancreática.[48] Tiempo después, Patterson[50] reportó que la angiostatina producida por la actividad proteolítica de MMP-7 y -9 estaba compuesta por los primeros 4 dominios del plasminógeno con un peso molecular de 58 kDa. Las diferentes subespecies de angiostatina y los dominios que las componen y, así como los posibles sitios de hidrólisis se muestran en la figura 1.

Datos preliminares sugieren que la MMP-2 actúa sobre el plasminógeno para producir especies de angiostatina con pesos moleculares intermedios (40-45 kDa, O'Reilly comunicación personal). La actividad anti-angiogénica de los dominios 1, 2, 3 y 4 de la angiostatina ha sido estudiada por Cao y cols., quienes mostraron que la actividad inhibitoria más potente se presenta en los dominios 1-3.[53, 54]

Planteamiento del Problema

De acuerdo a los estudios antes señalados que implican la probable participación de la angiostatina como inhibidor de la neovascularización corneal en procesos patológicos, el conocer el efecto del epitelio corneal sobre la degradación del plasminógeno y la formación de angiostatina en el mantenimiento de la homeostasis de la angiogénesis corneal, se plantearon una serie de experimentos utilizando el epitelio corneal de ratones silvestres y transgénicos para lo cual utilizamos la siguiente estrategia: 1) Efecto de las células epiteliales de la córnea de ratones silvestres sobre el plasminógeno y producción de angiostatina *in vitro*; analizando los productos obtenidos por electrotransferencia a través de anti cuerpos específicos contra los dominios 1 a 3 del plasminógeno, componentes principales de la angiostatina. 2) Efecto de las células epiteliales de la córnea de ratones transgénicos para MMPs-7 y -12, enzimas que han demostrado su papel catalítico sobre el plasminógeno y consecuente producción de angiostatina. 3) Efecto del inhibidor sintético de metaproteasa (SIMP) y ϵ -ácido amino caproico (ϵ -ACA) sobre la degradación de plasminógeno y producción de angiostatina.

Justificación

La neovascularización corneal puede resultar de una lesión corneal química, traumática o infecciosa severa, siendo una de las primeras causas de ceguera legal, secundaria a problemas corneales en el mundo. Los factores que intervienen en el mantenimiento de la ausencia de vasos sanguíneos de la córnea en condiciones fisiológicas no han sido completamente elucidadas y es en este punto particular en el que el estudio de sustancias anti-angiogénicas con potencial terapéutico es de suma importancia.

Hipótesis

1. El epitelio corneal de ratones silvestres genera angiostatina a partir de la degradación proteolítica del plasminógeno *in vitro*.
2. La degradación de plasminógeno y la producción de angiostatina por las células corneales epiteliales de ratones transgénicos para MMPs-7 y -12 están disminuidas.
3. La degradación de plasminógeno por el epitelio corneal *in vitro* disminuye por la adición de inhibidores de la plasmina y de SIMPs.
4. La producción de angiostatina por el epitelio corneal *in vitro* disminuye por la adición de inhibidores de la plasmina y de SIMPs.

Objetivo

Determinar la capacidad proteolítica del epitelio corneal sobre el plasminógeno y producción de angiostatina.

Metas

1. Determinar el efecto de las células epiteliales corneales sobre la degradación de plasminógeno *in vitro*.

Justificación

La neovascularización corneal puede resultar de una lesión corneal química, traumática o infecciosa severa, siendo una de las primeras causas de ceguera legal, secundaria a problemas corneales en el mundo. Los factores que intervienen en el mantenimiento de la ausencia de vasos sanguíneos de la córnea en condiciones fisiológicas no han sido completamente elucidadas y es en este punto particular en el que el estudio de sustancias anti-angiogénicas con potencial terapéutico es de suma importancia.

Hipótesis

1. El epitelio corneal de ratones silvestres genera angiostatina a partir de la degradación proteolítica del plasminógeno *in vitro*.
2. La degradación de plasminógeno y la producción de angiostatina por las células corneales epiteliales de ratones transgénicos para MMPs-7 y -12 están disminuidas.
3. La degradación de plasminógeno por el epitelio corneal *in vitro* disminuye por la adición de inhibidores de la plasmina y de SIMPs.
4. La producción de angiostatina por el epitelio corneal *in vitro* disminuye por la adición de inhibidores de la plasmina y de SIMPs.

Objetivo

Determinar la capacidad proteolítica del epitelio corneal sobre el plasminógeno y producción de angiostatina.

Metas

1. Determinar el efecto de las células epiteliales corneales sobre la degradación de plasminógeno *in vitro*.

2. Determinar el efecto de las células epiteliales corneales sobre la producción de angioestatina *in vitro*.
3. Determinar el efecto del ϵ -ACA sobre la degradación de plasminógeno y la producción de angioestatina por células corneales epiteliales *in vitro*.
4. Determinar el efecto de SIMP sobre la degradación de plasminógeno y la producción de angioestatina por células corneales epiteliales *in vitro*.

Material y Métodos

Animales

Todos los animales en este estudio se manejaron de acuerdo a la Guía de Manejo de Animales de Investigación de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (Association for Research in Vision and Ophthalmology). Se utilizaron 30 ratones cepa C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), cuatro ratones transgénicos para MMP-7 donados por el Dr. L.M. Matrisian (Vanderbilt University, Nashville, TN) y 4 ratones transgénicos para MMP-12 donados por el Dr. S. Shapiro (Barnes Jewish Hospital, St. Louis, MO).

Obtención del Epitelio Corneal

Se utilizó el epitelio corneal del ojo derecho de cada uno de los ratones. Antes de la obtención del epitelio corneal, los animales fueron anestesiados con una inyección intramuscular de 0.5 – 0.7 ml/kg de peso de una mezcla de ketamina (100 mg/ml; Ketalar, Parke-Davis, Morris Plains, NJ), xilazina (20 mg/ml), y promazina (33 mg/ml) y la aplicación tópica de una gota de proparacaína al 0.5%. Bajo observación microscópica (OMS-70, Topcon, Japón, lente $f=175$, magnificación 9.7x) se obtuvieron 3 mm centrales del epitelio corneal con una hoja de bisturí del no. 15.

Aunque no se determinó el porcentaje de células epiteliales, en el campo de la oftalmología, es común que al realizar el raspado epitelial, para diferentes procedimientos quirúrgicos,[55] solo se obtenga esta estirpe celular. Además, en el estudio de la cinética celular, después del raspado corneal, se ha demostrado histológicamente que la técnica con hoja de bisturí, únicamente remueve el epitelio corneal.[56] Las muestras de epitelio se

depositaron en un solo tubo de colección y estos fueron almacenados a -70°C hasta la fase de incubación.

Fases e Incubaciones

El proyecto esta dividido en 4 fases, en las fases 2 y 3 los experimentos se realizaron por triplicado.

En la primera fase, después de descongelar el epitelio a temperatura ambiente ($20-24^{\circ}\text{C}$), el epitelio se homogeneizó con una solución de PO_4 50 mM, pH 7.4, se centrifugó a 16,000 g, y el sobrenadante se utilizó para los experimentos. Se determinó la concentración óptima de sustrato (plasminógeno) y del componente enzimático (epitelio corneal). Se utilizaron 4 concentraciones de plasminógeno: 3.9×10^{-3} M, 1.9×10^{-3} M, 9.4×10^{-4} M, 4.8×10^{-4} M y 2.4×10^{-4} M. El plasminógeno utilizado en las incubaciones fue Glu-plasminógeno humano (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT). El epitelio fue incubado en una solución de PO_4 50 mM a 37°C durante 48 h. Las reacciones fueron detenidas con un amortiguador 5 mM EDTA, 2 $\mu\text{g/ml}$ Laupepting, 125 mM Tris pH 6.8, 2% SDS y 20% glicerol. Las muestras fueron entonces preparadas y analizadas por la técnica de electrotransferencia, indicada mas adelante.

Una vez determinada la concentración de plasminógeno que producía la mayor expresión de angiostatina (3.9×10^{-3} M) en una razón de 1:20 (plasminógeno:tejido epitelial), en la segunda fase se determinó la relación temporal de esta incubación. Para estas dos fases se utilizaron el epitelio corneal del ojo derecho de 20 ratones silvestres. En al segunda y tercera fase se utilizó la razón 1:20 (plasminógeno:tejido epitelial) y se incubaron las muestras a 37°C con plasminógeno humano durante diferentes períodos de tiempo: 0, 6, 12, 24 y 48 h.

En la tercera fase se realizaron incubaciones con el epitelio corneal proveniente de 4 ratones transgénicos para MMP-7 y -12 para comparar los resultados con los de los ratones silvestres. Las condiciones de incubación fueron similares a las de la fase 2.

En una cuarta fase se obtuvo el epitelio corneal del ojo derecho de 10 ratones silvestres. Este epitelio se incubó con plasminógeno, se adicionaron inhibidores de proteasas, ya sea ϵ -ACA (Sigma, St. Louis, MO) o SIMP ((2R)-2-Mercaptometil-4-Metipentanoil L-Fenilalanil-L-Alanina Amida, Peptides International Inc., Louisville, KY). La relación sustrato:enzima utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante y las estimadas a través de otros investigadores en ensayos de incubación similares para MMPs[57, 58] y concentraciones plasmáticas de uso clínico para el ϵ -ACA.[59] Estos inhibidores fueron probados a diferentes concentraciones.

Todos los experimentos tuvieron incubaciones controles: epitelio no incubado, plasminógeno no incubado, epitelio incubado sin plasminógeno y plasminógeno incubado sin epitelio.

Electrotransferencia

Después de haber detenido las reacciones, agregando 5mM EDTA, 2 mg/ml Laupepting, 125 mM Tris pH 6.8, 2% SDS y 20% glicerol, fueron analizadas por la técnica de electrotransferencia en condiciones no reductoras.[48, 60] La cantidad de proteína cargada por carril se calculó a través de un ensayo proteico dotMETRIC (Chemicon International, Inc., Temecula, CA), se utilizó un estándar interno incluido en el ensayo. Las muestras se mezclaron con un volumen 1:1 de amortiguador de muestra (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% glicerol, 10% SDS y 0.1% Azul de bromofenol). Se calentaron durante 3 min. a 100°C. Se corrieron por electroforesis en gel de 10% SDS durante 2 h 30 min. a un voltaje de 125

volts en una solución amortiguadora Tris-Glicina. Posteriormente fueron electrotransferidas a una membrana de 0.20 μm de difluoruro de polivinileno (PVDF, Novex, San Diego, CA) durante 90 min. a una corriente de 80 mAmp. Se bloquearon con una solución de PO_4 , 50 mM, pH 7.4, caseína al 5% durante una h. Después de 3 lavados con solución de PO_4 50 mM, se incubaron por la noche a -20°C , con el anticuerpo primario: anticuerpo policlonal anti-K1-K3 plasminógeno humano originado en conejo (dilución 1/250), (Biogenesis, Inc., Sandown, NH). Después de una segunda serie de 3 lavados (10 min.) con PO_4 se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1/2000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA), y se reveló usando 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato/nitroazul cloruro de tetrazolio (Boehringer Mannheim, Germany).

La identificación de cada una de las fracciones en las membranas se realizó de acuerdo a un marcador de peso molecular (Gibco BRL protein ladder, Life Technologies, Rockville, MD), adicionalmente se realizó un análisis densitométrico. Las membranas, después de la electrotransferencia, fueron digitalizadas en un formato de gráfico PCX con un digitalizador Duoscan f 40 (AGFA, Notario, Canadá). La imagen fue importada al programa 1D Main advanced TLC program (Advanced American Biotechnology, Fullerton, CA) y se seleccionaron los carriles para análisis. Se capturaron los pesos moleculares de acuerdo al marcador estándar. Para el análisis, las imágenes fueron optimizadas a través de una normalización del fondo (*None linear global background correction*).

Resultados

Primera fase

Al realizar la electrotransferencia, se encontró que el plasminógeno tuvo un peso molecular aproximado de 116 kDa. Después de incubar el epitelio corneal de ratón silvestre con diferentes concentraciones de plasminógeno, durante 12 h, se observó mayor producción de angiostatina conforme aumentó la concentración de plasminógeno (Fig. 2, carriles 2 y 6 a 9; Fig 3). La incubación del epitelio corneal, sin agregar plasminógeno, expresó una menor cantidad de plasminógeno y una proteína de aproximadamente 58 kDa (Fig. 2, carril 3, angiostatina). La mayor carga de plasminógeno (3.9×10^{-3} M) mostró la mayor cantidad de plasmina y angiostatina (Fig. 2, carril 2; Fig 3), comparado con la menor carga de plasminógeno en donde a las 12 h de incubación, se observó menor expresión de angiostatina (Fig. 2, carril 9).

Segunda fase

De acuerdo a los resultados de la primera fase, para la segunda fase del estudio se realizaron experimentos con una carga por carril de 3.3 μ g de proteína y una concentración de plasminógeno de 3.9×10^{-3} M. Durante la incubación del plasminógeno humano con epitelio corneal de ratón silvestre se observó una disminución de la cantidad de plasminógeno directamente proporcional al tiempo de incubación (Fig. 4, carriles 6 a 10, P; Fig 5). Los niveles de angiostatina permanecieron constantes durante los diferentes tiempos de incubación. En contraste el plasminógeno no sufrió degradación cuando se incubó durante 24 h sin agregar epitelio corneal de ratón (Fig. 4, carril 3) y sin incubación alguna (Fig. 4, carril 2). El epitelio corneal incubado sin adicionar plasminógeno no mostró una expresión de plasminógeno. Los niveles de plasminógeno se mantuvieron bajos en las

muestras no incubadas como en las incubadas durante 24 h (Fig. 4, carriles 4 vs. 5) y hasta las 48 h (Fig. 6, carril 3).

El análisis densitométrico (Fig. 5) mostró una disminución en la densidad óptica del plasminógeno humano asociado al tiempo de incubación. En contraste, la angiostatina se mantuvo con niveles constantes.

Los experimentos controles, en donde se incubó el plasminógeno y el epitelio corneal en forma independiente en diferentes puntos en el tiempo se muestran en la figura 6. El plasminógeno en ausencia de epitelio corneal no se afectó por el tiempo de incubación, por lo menos hasta las 48 h (Fig. 6, carriles 1-3, P). Los niveles de angiostatina en el epitelio corneal incubado en ausencia del plasminógeno humano se mantuvieron constantes durante 48 h de incubación (Fig. 6, carriles 4-6,A).

Tercera fase

Las incubaciones realizadas con el epitelio corneal de ratones transgénicos para MMP-7 y -12 con plasminógeno humano presentaron un degradación de plasminógeno y niveles constantes de angiostatina a través del tiempo, muy similares a los observados en los experimentos realizados con epitelio corneal de ratones silvestres (Fig. 7 vs. 4, 8 y 9 vs. 5).

Los experimentos controles del epitelio corneal proveniente de los ratones transgénicos (Fig. 10) se comportaron de manera similar a las incubaciones del epitelio corneal de ratones silvestres con expresión de plasminógeno durante los diferentes tiempos de incubación y niveles estables de angiostatina con una banda de mayor definición (Fig. 6, carriles 4-6).

Cuarta fase, efecto de los inhibidores de proteasas: las incubaciones con el SIMP (Fig. 11, carriles 3-6, P) no mostraron resultados diferentes sobre la degradación de plasminógeno a

las 48 h, al compararse con las incubaciones en ausencia de SIMP en ratones silvestres (Fig. 4, carril 9) o en transgénicos (Fig. 7, carril 8). Sin embargo, se observó un menor nivel de angiostatina conforme se aumentó la concentración del SIMP (Fig. 11, carriles 3 a 6, A; Fig. 12).

La incubación durante 48 h de las células del epitelio corneal de ratón silvestre con plasminógeno humano adicionando diferentes concentraciones de ϵ -ACA se muestra en la figura 13. La degradación de plasminógeno disminuye conforme aumenta la concentración de ϵ -ACA (Fig. 13, carriles 3 a 5, P; Fig. 14). En contraste, el plasminógeno es completamente degradado cuando el ϵ -ACA no es agregado (Fig. 13, carril 2, P). El plasminógeno incubado sin tejido no se degrada después de 48 h de incubación (Fig. 13, carril 1, P). Los niveles de angiostatina parecen aumentar conforme se aumenta la concentración de ϵ -ACA (Fig. 13, carriles 3 a 6, A; Fig 14). En forma similar a los experimentos anteriores, la angiostatina no se genera al incubar al plasminógeno en ausencia de células epiteliales (Fig. 13, carril 1) y su expresión es la esperada al adicionarse tejido epitelial (Fig. 13, carril 2).

Discusión

La angiostatina es un potente inhibidor de la angiogénesis, que tiene como blanco específico a las células endoteliales proliferantes.[48, 61] En el presente trabajo estudiamos la capacidad enzimática de las células epiteliales corneales de ratón para la generación de angiostatina a partir de plasminógeno humano en un sistema enzimático celular *in vitro*.

Las patologías corneales cursan con vascularización corneal y son causa importante de ceguera legal, definida por la Organización Mundial de la Salud como una agudeza visual de 3/60 (0.05) o pérdida correspondiente en el campo visual en el mejor ojo con la mejor corrección posible. Corresponde a la pérdida de la visión suficiente para caminar.[62] La identificación de agentes inhibidores de la angiogénesis representa ahora un abordaje terapéutico potencial para el control de la neovascularización corneal.

Digestión de Plasminógeno por el Epitelio Corneal

El plasminógeno humano está formado por una cadena que contiene 791 aminoácidos con un sitio de N-glicosilación en la Asn²⁸⁹ y un sitio de O-glicosilación en la Thr³⁴⁶. La región no-proteásica del plasminógeno se encuentra dentro de los 461 aminoácidos del extremo amino terminal. El dominio amino terminal está formado también por un péptido de “preactivación”. Hacia el extremo carboxi-terminal le siguen 5 dominios. Las secuencias de cada dominio contienen entre 78 y 80 residuos de aminoácidos. La angiostatina contiene los 4 primeros dominios del plasminógeno empezando en el residuo Lys⁷⁸, en el extremo amino terminal. Fragmentos de los dominios 1-4, 1-3 y 4 son obtenidos a partir de la digestión del plasminógeno por la elastasa.[53]

Varias enzimas son capaces de catalizar la conversión de plasminógeno a angiostatina *in vitro*, sin embargo, aunque no se conocen a las proteasas responsables de esta conversión *in*

vivo. La uroquinasa (uPA) y los donadores de sulfidrilos libres (FSDs) generan angiostatina.[51] En sistemas aislados de componentes celulares, los activadores del plasminógeno [uPA, activador del plasminógeno tipo-tisular (tPA) o la estreptoquinasa] en combinación con una serie de FSDs (N-acetil-L-cisteína, D-penicilamina, captopril, L-cisteína, o glutatión reducido) producen angiostatina a partir del plasminógeno.[51]

La uPA o el tPA convierten el plasminógeno a plasmina por hidrólisis de la unión peptídica entre la Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶². La activación resulta en la producción autoproteolítica de un péptido amino terminal por la ruptura de la unión peptídica entre Lys⁷⁷-Lys⁷⁸. El quinto dominio (cadena pesada) está unido covalentemente a la serina de la proteasa. Las incubaciones realizadas por Stathakis y cols.[63] con células de ovario de hámster chino resultaron en la formación de los primeros cuatro dominios de la plasmina, con un amino terminal de Lys-Val-Tyr-Leu-Ser-Glu que corresponde a la Lys⁷⁸ de la plasmina. Esta estructura corresponde a la angiostatina.[48]

Se ha demostrado un papel catalítico importante de la plasmina para la generación de angiostatina a través de plasminógeno recombinante como sustrato.[51] Sin embargo esta capacidad de conversión de la plasmina solo se logró en presencia de N-acetil-L-cisteína.[51]

En el presente estudio, las células epiteliales de la córnea de ratón fueron capaces de degradar el plasminógeno. Dichas células tienen un complejo enzimático con capacidad catalítica sobre el plasminógeno.

Producción de Angiostatina por las Células del Epitelio Corneal

No se conoce el origen *in vivo* de la angiostatina en la córnea. Es poco probable que las células epiteliales corneales la produzcan ya que carecen de RNAm detectable para

plasminógeno (Ye, H. comunicación personal). En nuestro laboratorio, hemos demostrado que el plasminógeno llega al epitelio corneal a través de la película lagrimal.[49] No existen otros estudios en donde se pretenda determinar el origen de la angiostatina en la córnea.

La manipulación extracelular de las uniones disulfuro de diferentes proteínas, se ha implicado en varios procesos biológicos, incluyendo la penetración de los virus y las endotoxinas a las células y la activación de ciertos receptores de citosinas.[63] Stathakis y cols., demostraron que la reducción de una o más uniones disulfuro en la serin-proteasa y plasmina, por una reductasa producida por células de ovario de hámster chino o células HT1080. La reductasa de plasmina producida por dichas células requiere de un pequeño cofactor para lograr su actividad y parece ser el glutatión el que realiza este papel. Estos resultados apoyan la actividad de la plasmina dentro de la angiogénesis.[63]

La capacidad inhibitoria de los diferentes dominios de la angiostatina sobre el endotelio vascular fue estudiada por Cao y cols.[53] En dichos estudios, determinaron los pesos moleculares de los dominios y de las subespecies de la angiostatina. En este mismo estudio, se reportó la capacidad inhibitoria en forma individual y combinada de los diferentes dominios de la angiostatina. Los diferentes dominios de la angiostatina obtenidos por digestión elastótica de Lys-plasminógeno humano han revelado un peso molecular de 45 kDa para el fragmento K1-4 y de 38 kDa para el fragmento K1-3. Otros fragmentos mostraron pesos moleculares menores (K2-3, 21 kDa).[53]

De los diferentes dominios de la angiostatina, el primero es el que tiene una mayor inhibición sobre las células endoteliales vasculares.[53]

El cuarto dominio es el único que contiene 2 pares de lisinas cargadas positivamente, cada una adyacente a la Cys²² y Cys⁸⁰. El análisis de la estructura tridimensional, muestra que

estas cuatro lisinas juntas con Lys⁵⁹, configuran y exponen un área cargada positivamente en el dominio 4, mientras que los otros dominios carecen de este agrupamiento catiónico, se desconoce el significado fisiológico de este hallazgo.[53]

La secuenciación de la angiotatina ha demostrado que es idéntica a un fragmento interno del plasminógeno en el ratón empezando por el residuo Val⁷⁹. [48]

Basado en su peso molecular, el extremo carboxi- terminal de la angiotatina se estima en el residuo 440 del plasminógeno. De esta forma, la angiotatina esta formada por las cuatro primeras estructuras de asas triples-disulfuro. Los fragmentos proteolíticos del plasminógeno humanos, así como la angiotatina murina, inhiben la proliferación vascular endotelial *in vitro*. [46]

En los experimentos realizados, la adición de plasminógeno humano no fue necesaria para que los niveles de angiotatina se mantuvieran constantes a través del tiempo cuando las células epiteliales corneales del ratón se incubaron a 37°C durante 48 h. Sin embargo, los niveles de angiotatina aumentaron una vez que el plasminógeno fue agregado. Este aumento no esta asociado con el tiempo de incubación, sino que se mantiene constante por lo menos durante 48 h. Es posible que los niveles estables de angiotatina sean resultado de un balance entre la producción y la degradación de esta proteína. Por un lado, el epitelio corneal degrada al plasminógeno, produce angiotatina y por el otro, la angiotatina es degradada por otras proteasas. [51] Esta hipótesis es apoyada por los hallazgos de Patterson y cols. [50] quienes en un sistema libre de células incubaron plasminógeno con MMP-9 y – 7, donde los niveles de plasminógeno disminuyeron con relación al tiempo de incubación y los niveles de angiotatina permanecieron constantes, los productos de menor peso

molecular fueron identificados por Patterson y cols. a través de una tinción de plata del gel (SDS12% - PAGE) después de la electroforesis.

Papel de las MMPs en la Degradación del Plasminógeno y producción de Angiostatina

Las MMPs y los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP) tienen un papel importante en la regulación de la angiogénesis. La colagenasa intersticial (MMP-1), la gelatinasa A de 72 kDa (MMP-2) y la gelatinasa B de 92 kDa (MMP-9) disuelven la matriz extracelular y pueden iniciar y promover la angiogénesis. Probablemente TIMP-1 a -4 inhiben la angiogénesis. El nuevo paradigma nace a partir de cierta evidencia en donde matrilisina (MMP-7), MMP-9 y la metaloelastasa (MMP-12) bloquean la angiogénesis a partir de la conversión de plasminógeno a angiostatina.[64]

Patterson y cols.[50] mostraron la capacidad catalítica de MMP-7 y -9 sobre el plasminógeno y producción de angiostatina *in vitro*. Ambas producen degradación del plasminógeno entre el dominio 4 y 5 para generar angiostatina. La MMP-7 produce ruptura entre la Pro⁴⁶⁶-Val⁴⁶⁷, y la MMP-9 entre Pro⁴⁶⁵-Pro⁴⁶⁶. La MMP-12 también ha mostrado su capacidad para producir angiostatina a partir de plasminógeno.[44]

A pesar de la evidencia *in vitro* de la capacidad de MMP-7[50] y -12[44] para degradar el plasminógeno y producir angiostatina *in vitro*, la incubación de epitelio corneal de ratones transgénicos (con deficiencia de MMP-7 y -12) con plasminógeno no reveló disminución en la degradación de plasminógeno, ni en la producción de angiostatina. Esta observación puede ser el resultado de una compensación catalítica por otras enzimas proteolíticas (otras MMPs y plasmina) de plasminógeno y productoras de angiostatina en ratones transgénicos.

Incubaciones con ϵ -ACA y el papel potencial de la plasmina

Los estudios realizados de incubaciones con inhibidores de proteasas son pocos.[63] En el presente estudio se observó una pérdida importante de la capacidad catalítica de las células epiteliales de ratón silvestre sobre el plasminógeno al adicionar ϵ -ACA. En un estudio realizado por Stathakis y cols.,[63] no encontraron cambios en la producción de angiostatina al pre-incubar células de ovario de hámster chino con 25mM de ϵ -ACA durante 30 min. Los experimentos realizados por este autor difieren en forma considerable respecto al presente estudio por lo que sus resultados probablemente no sean, del todo, comparables. Las células de ovario de hámster chino son diferentes a las células epiteliales de la córnea de ratón cepa C57BL/6J. En el presente estudio se incubaron células adicionando plasminógeno, en el estudio comentado se adicionó plasmina. Las incubaciones en el estudio anterior fueron por 3 y 6 h vs. 6, 12, 24 y 48 h. En el presente estudio las incubaciones se realizaron durante 48 h, en el estudio con células de hámsteres se pre-incubaron con ϵ -ACA durante 20 minutos. El anticuerpo utilizado en el previo estudio fue policlonal anti-plasminógeno humano de conejo, en el presente estudio se utilizaron anti-cuerpos anti K1-K3 del plasminógeno,

De los supresores endoteliales vasculares caracterizados, varios son formados de fragmentos proteolíticos. Por ejemplo, el fragmento terminal de 16 kDa de la prolactina humana inhibe la proliferación celular endotelial y la angiogénesis *in vivo*. [65] Al igual que la molécula intacta de prolactina, no inhibe la proliferación celular endotelial, ni la angiogénesis. Fragmentos pequeños peptídicos de la fibronectina, factor de crecimiento epidérmico murino, y la trombospondina también han mostrado una inhibición selectiva del crecimiento celular endotelial vascular.[66-68] Por lo anterior, es plausible que la

angiostatina, con propiedades anti-angiogénicas se produzca a partir del plasminógeno, que es una molécula de mayor peso molecular sin actividad angiogénica.

La capacidad catalítica sobre el plasminógeno de las células epiteliales de la cornea de ratones transgénicos para MMP-7 y -12, puede estar conservada por la participación de otras enzimas proteolíticas que compensan la deficiencia de MMPs. Actualmente, se está trabajando en el laboratorio con el desarrollo de ratones transgénicos combinados (MMP-7 + -12) para investigar este punto.

Las células corneales pueden expresar uno o más factores angiogénicos que funcionan en forma sinérgica para promover la vascularización corneal en condiciones patológicas. Aunque la expresión de factores angiogénicos en la córnea es necesaria para la formación de nuevos vasos, no es suficiente para la que la córnea se vascularice.

Existe evidencia, realizada por nuestro grupo, en el que la neutralización de plasminógeno y angiostatina a través de anticuerpos específicos inyectados en la cornea que ha sufrido lesión con láser Excimer promueve la neovascularización corneal.[49] La relevancia y significación fisiológica de la generación de angiostatina por las células epiteliales corneales aun debe investigarse.

Conclusiones

1. El epitelio corneal del ratón tiene capacidad enzimática de degradar el plasminógeno humano *in vitro*.
2. Los niveles de angiostatina se mantienen constantes durante la incubación de las células epiteliales corneales del ratón a través del tiempo.
3. La incubación de epitelio corneal de ratones transgénicos (con deficiencia de MMP-7 y -12) con plasminógeno no reveló disminución en la degradación de plasminógeno, ni en la producción de angiostatina.
4. El ácido ϵ -amino-n-caproico inhibió la degradación proteolítica del plasminógeno y la angiostatina en forma dosis dependiente.
5. El inhibidor sintético de MMPs (SIMP) no alteró significativamente la degradación del plasminógeno, pero resultó en una disminución en los niveles de angiostatina de manera dosis dependiente.

Referencias

1. Folkman, J. and M. Klagsbrun, Angiogenic Factors. *Science*, 1987. 235: 442-447.
2. Casey, R. and W.W. Li, Factors Controlling Ocular Angiogenesis. *Am J Ophthalmol*, 1997. 124: 521-529.
3. Winigman-Voos, S., W. Breier and W. Risau, Upregulation of VEGF and its receptor in Von Hippel-Lindau disease associated and sporadic hemangioendotheliomas. *Cancer Res*, 1995. 55: 1358-1364.
4. Anand-Apte, B., M.S. Pepper and E. Voest, Inhibition of angiogenesis by TIMP-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997. 38: 817-823.
5. Ausprunk, D.H. and J. Folkman, Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, 1977. 14: 53-65.
6. Burr, L.P.H., *Intussusceptive macrovascular growth: a new mechanism of capillary network formation in angiogenesis*, in *Key principles of science, technology, medicine.*, R. Steiner, P.B. Weisse, and R. Langer, Editors. 1992, Basel: Birkhauser Verlag. p. 393-400.
7. Risau, W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1977. 386: 671-674.
8. Folkman, J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971. 285: 1182-6.
9. Gimbrone, M.A., S.B. Leapman, R.S. Cotran and J. Folkman, Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med*, 1972. 136: 261-76.

10. Folkman, J., Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg*, 1972. 175: 409-16.
11. Bazzoni, F. and E. Regalia, Triggering of antitumor activity through melanoma-specific transduction of a constitutively active tumor necrosis factor (TNF) R1 chimeric receptor in the absence of TNF-alpha. *Cancer Res*, 2001. 61: 1050-7.
12. Calderwood, S., L. Kilpatrick, S.D. Douglas, M. Freedman, K. Smith_Whitley, M. Rolland and J. Kurtzberg, Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor therapy for patients with neutropenia and/or neutrophil dysfunction secondary to glycogen storage disease type 1b. *Blood*, 2001. 97: 376-82.
13. de_Jong, J.S., P.J. van_Diest, P. van_der_Valk and J.P. Baak, Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res Treat*, 2001. 66: 201-8.
14. Geng, L., E. Donnelly, G. McMahon, P.C. Lin, E. Sierra_Rivera, H. Oshinka and D.E. Hallahan, Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res*, 2001. 61: 2413-9.
15. Golb, J., K. Kozar, R. Kaminski, A. Czajka, M. Marczak, T. Switaj, A. Giermasz, T. Stoklsa, W. Lasek, R. Zagozdzon, K. Mucha and M. Jakobisiak, Interleukin 12 and indomethacin exert a synergistic, angiogenesis-dependent antitumor activity in mice. *Life Sci*, 2000. 66: 1223-30.
16. Guo, L., N. Kuroda, M. Toi, E. Miyazaki, Y. Hayashi, H. Enzan and Y. Jin, Increased expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in human hepatocellular carcinomas correlated with high Edmondson grades and portal vein tumor thrombosis. *Oncol Rep*, . 8: 871-6.

17. Hagedorn, M., L. Zilberberg, R.M. Lozano, P. Cuevas, X. Canron, M. Redondo_Horcajo, G. Gimenez_Gallego and A. Bikfalvi, A short peptide domain of platelet factor 4 blocks angiogenic key events induced by FGF-2. *FASEB J*, 2001. 15: 550-2.
18. Iyer, S., D.D. Leonidas, G.J. Swaminathan, D. Maglione, M. Battisti, M. Tucci, M.G. Persico and K.R. Acharya, The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem*, 2001. 276: 12153-61.
19. Kanda, N., K. Nakai and S. Watanabe, Gangliosides gd1b, gt1b, and gq1b suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8 production: the inhibition of adenylate cyclase. *J Invest Dermatol*, 2001. 117: 284-93.
20. Ko, Y.J., E.J. Small, F. Kabbinavar, A. Chachoua, S. Taneja, D. Reese, A. DePaoli, A. Hannah, S.P. Balk and G.J. Bubley, A multi-institutional phase ii study of SU101, a platelet-derived growth factor receptor inhibitor, for patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2001. 7: 800-5.
21. Lai, C., W. Wu, S. Chen, X. Xiao, T. Tsai, S. Huan, T. Chen, R. Tsai and Y. Tsao, Suppression of choroidal neovascularization by adeno-associated virus vector expressing angiostatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. 42: 2401-7.
22. Latasa, M.U., A. Boukaba, E.R. Garcia_Trevijano, L. Torres, J.L. Rodriguez, J. Caballeria, S.C. Lu, G. Lopez_Rodas, L. Franco, J.M. Mato and M.A. Avila, Hepatocyte growth factor induces MAT2A expression and histone acetylation in rat hepatocytes: role in liver regeneration. *FASEB J*, 2001. 15: 1248-50.

23. Liekens, S., E. De_Clercq and J. Neyts, Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 2001. 61: 253-70.
24. Liu, S., D. Yu, Xu_Zp, J.F. Riordan and Hu_Gf, Angiogenin activates erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 287: 305-10.
25. Meyers, M., A. Gagliardi, G. Flattmann, J. Su, Y. Wang and E. Woltering, Suramin analogs inhibit human angiogenesis in vitro. *J Surg Res*, 2000. 91: 130-4.
26. Myoung, H., S.D. Hong, Y.Y. Kim, S.P. Hong and M.J. Kim, Evaluation of the anti-tumor and anti-angiogenic effect of paclitaxel and thalidomide on the xenotransplanted oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*, 2001. 163: 191-200.
27. Neben, K., T. Moehler, G. Egerer, A. Kraemer, J. Hillengass, A. Benner, A. Ho and H. Goldschmidt, High plasma basic fibroblast growth factor concentration is associated with response to thalidomide in progressive multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 2001. 7: 2675-81.
28. O_Blenes, C.A., C. Kinnear and M. Rabinovitch, Tumor necrosis factor-alpha induces fibronectin synthesis in coronary artery smooth muscle cells by a nitric oxide-dependent posttranscriptional mechanism. *Circ Res*, 2001. 89: 26-32.
29. Patel, S., J. Jenkins, N. Papadopolous, M. Burgess, C. Plager, J. Gutterman and R. Benjamin, Pilot study of vitaxin--an angiogenesis inhibitor-in patients with advanced leiomyosarcomas. *Cancer*, 2001. 92: 1347-8.
30. Sachdeva, G., V. Patil, R.R. Katkam, D.D. Manjramkar, S.D. Kholkute and C.P. Puri, Expression Profiles of Endometrial Leukemia Inhibitory Factor, Transforming

- Growth Factor beta2 (TGFbeta2), and TGFbeta2 Receptor in Infertile Bonnet Monkeys. *Biol Reprod*, 2001. 65: 1-8.
31. Seidman, R., I. Gitelman, O. Sagi, S.B. Horwitz and M. Wolfson, The role of ERK 1/2 and p38 MAP-kinase pathways in taxol-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 2001. 268: 84-92.
 32. Seki, N., J. Kodama, I. Hashimoto, A. Hongo, M. Yoshinouchi and T. Kudo, Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal and neoplastic endometrial tissues: Correlation with angiogenesis and prognosis. *Int J Oncol*, 2001. 19: 305-10.
 33. Shen, B.Q., D.Y. Lee, K.M. Cortopassi, L.A. Damico and T.F. Zioncheck, Vascular endothelial growth factor KDR receptor signaling potentiates tumor necrosis factor-induced tissue factor expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2001. 276: 5281-6.
 34. Wickstrom, S.A., T. Veikkola, M. Rehn, T. Pihlajaniemi, K. Alitalo and J. Keski_Oja, Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res*, 2001. 61: 6511-6.
 35. Folkman, J., M. Klagsbrun, J. Sasse, M. Wadzinski, D. Ingber and I. Vlodavsky, A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *Am J Pathol*, 1988. 130: 393-400.
 36. Aiello, L.P., R.L. Avery, P.G. Arrigg, B.A. Keyt, H.D. Jampel, S.T. Shah, L.R. Pasquale, H. Thieme, M.A. Iwamoto and J.E. Park, Vascular endothelial growth

- factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*, 1994. 331: 1480-7.
37. Chang, Y.S., E. di_Tomaso, D.M. McDonald, R. Jones, R.K. Jain and L.L. Munn, Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97: 14608-13.
38. Lobb, R.R. and J.W. Fett, Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry*, 1984. 23: 6295-9.
39. Thomas, D.P., Heparin, low molecular weight heparin, and heparin analogues. *Br J Haematol*, 1984. 58: 385-90.
40. Strydom, D.J., The angiogenins. *Cell Mol Life Sci*, 1998. 54: 811-24.
41. Folkman, J. and R. Cotran, Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol*, 1976. 16: 207-48.
42. Muthukkaruppan, V. and R. Auerbach, Angiogenesis in the Mouse Cornea. *Science*, 1979. 205.
43. Hirschi, K.K. and P.A. D_Amore, Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res*, 1996. 32: 687-98.
44. Dong, Z., R. Kumar, X. Yang and I.J. Fidler, Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1997. 88: 801-10.
45. O_Reilly, M.S., L. Holmgren, C. Chen and J. Folkman, Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med*, 1996. 2: 689-92.
46. O_Reilly, M.S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R.A. Rosenthal, Y. Cao, M. Moses, W.S. Lane, E.H. Sage and J. Folkman, Angiostatin: a circulating endothelial

cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1994. 59: 471-82.

47. Claesson_Welsh, L., M. Welsh, N. Ito, B. Anand_Apte, S. Soker, B. Zetter, M. O_Reilly and J. Folkman, Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95: 5579-83.
48. O_Reilly, M.S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R.A. Rosenthal, M. Moses, W.S. Lane, Y. Cao, E.H. Sage and J. Folkman, Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994. 79: 315-28.
49. Hernández-Quintela, E., D.T. Azar, M.S. O'Reilly, H.Q. Ye, P.C. Lu and M.D. Rachid, The role of angiostatin in the cornea after wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999. 40: S97.
50. Patterson, B.C. and Q.A. Sang, Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem*, 1997. 272: 28823-5.
51. Gately, S., P. Twardowski, M.S. Stack, D.L. Cundiff, D. Grella, F.J. Castellino, J. Enghild, H.C. Kwaan, F. Lee, R.A. Kramer, O. Volpert, N. Bouck and G.A. Soff, The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94: 10868-72.
52. O_Reilly, M.S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R.A. Rosenthal, M. Moses, W.S. Lane, Y. Cao, E.H. Sage and J. Folkman, Angiostatin: candidate for molecule of the year! *Gastroenterology*, 1994. 108: 1946-1948.

61. Folkman, J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995. 1: 27-31.
62. *Blindness and visual disability*, . 1998, World Health Organization: Geneva. p. Fact Sheet N 142.
63. Stathakis, P., M. Fitzgerald, L.J. Matthias, C.N. Chesterman and P.J. Hogg, Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. Catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells. *J Biol Chem*, 1997. 272: 20641-5.
64. Sang, Q.X., Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res*, 1998. 8: 171-7.
65. Clapp, C., J.A. Martial, R.C. Guzman, F. Rentier-Delure and R.I. Weiner, The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, 1993. 133: 1292-9.
66. Homandberg, G.A., J.E. Williams, D. Grant. B. Schumacher and R. Eisenstein, Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth. *Am J Pathol*, 1985. 120: 327-32.
67. Nelson, J., W.E. Allen, W.N. Scott, J.R. Bailie, B. Walker, N.V. McFerran and D.J. Wilson, Murine epidermal growth factor (EGF) fragment (33-42) inhibits both EGF- and laminin-dependent endothelial cell motility and angiogenesis. *Cancer Res*, 1995. 55: 3772-6.
68. Tolsma, S.S., O.V. Volpert, D.J. Good, W.A. Frazier, P.J. Polverini and N. Bouck, Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol*, 1993. 122: 497-511.

Tablas y figuras

Tabla 1. Factores involucrados en la angiogénesis y factores anti-angiogénicas

Pro-angiogénicos ‡	Anti-angiogénicos
Factor de crecimiento endotelial vascular ^{33, 14}	Angiostatina ^{21*}
Factor de crecimiento fibroblástico: básico y ácido ²⁷	Endostatina ^{34*}
Factor alfa de crecimiento transformador ¹³	Trombospondina ^{32*}
Factor beta de crecimiento transformador ³⁰	Factor de plaquetas 4 ^{17*} †
Factor alfa de necrosis tumoral ¹¹	Fibronectina ^{28*}
Angiogenina ²⁴	Prolactina ^{2*}
Factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas ¹⁶	Talidomida ²⁶ †
Interleucina 8 ¹⁹	Interleucina 12 ¹⁵ †
Factor estimulante de colonias de granulocitos ¹²	Vitaxina ²⁹ †
Factor de crecimiento placentario ¹⁸	Taxol ³¹ †
Factor de crecimiento de hepatocitos ²²	Suramin ²⁵ †
Pleitropina ²	CM101 ² †
Proliferina ²	Neovastat ²³ †
Filistatina ²	SU101 ¹⁰ †
Midkina ²	SU5416 ² †

* Inhibidores endógenos derivados de moléculas de mayor tamaño

† Agentes Inhibidores que han entrado a ensayos clínicos

‡ Factores endógenos

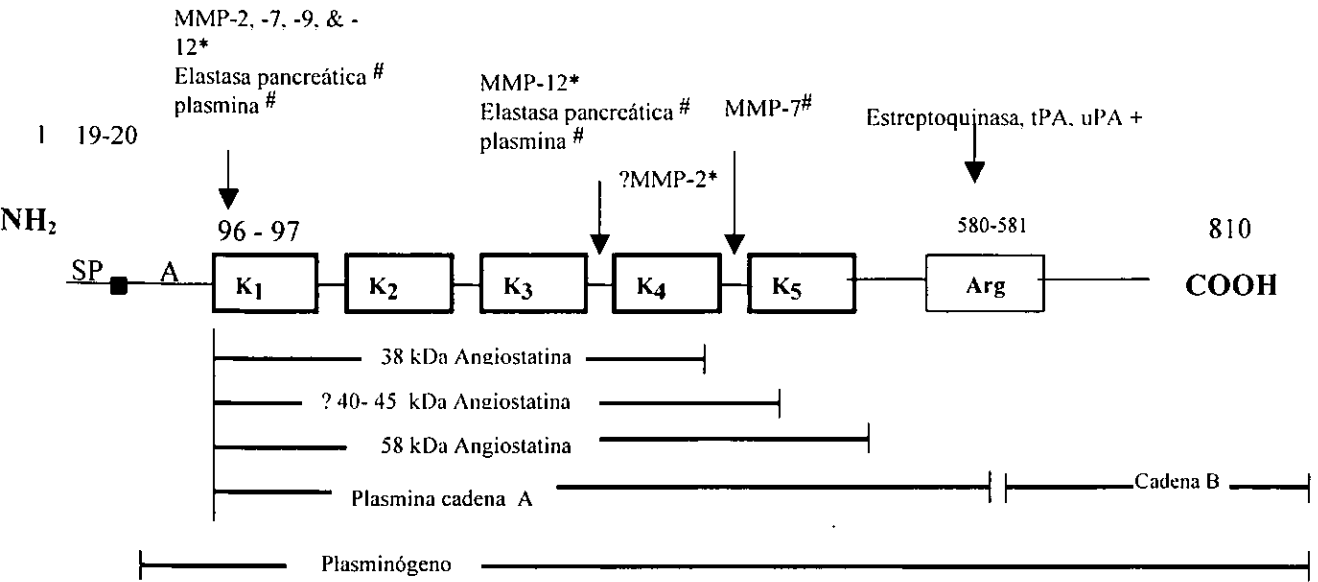


Figura 1. Estructura y sitios de hidrólisis del Plasminógeno. * Metaloproteasas: **MMP-12** (metaloelastasa), Dong y cols.,⁴⁴ 1997; **MMP-9** (Gelatinasa B) and **MMP-7** (Matrilisina), Patterson y cols.,⁵⁰ 1997; **MMP-2** (Gelatinasa A), O'Reilly, comunicación personal. # Serinas: **elastasa pancreática**, O'Reilly y cols.,⁴⁶ 1994; **plasmina**, Gately y cols.,⁵¹ 1997. + activadores del plasminógeno: **tPA** and **uPA**.

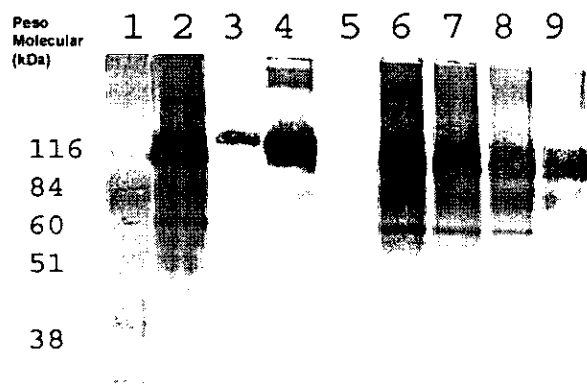


Figura 2. Análisis de electrotransferencia en condiciones no reductoras, que muestra la expresión de plasminógeno y sus productos al incubarlo con células epiteliales de ratón silvestre durante 12 horas. En todos los carriles se aplicó 3.3 μg de tejido epitelial. El anticuerpo primario utilizado fue: policlonal anti-K1-K3 plasminógeno humano originado en conejo, se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario y se reveló con 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato/nitroazul cloruro de tetrazolio. Carril 1: Marcador de peso molecular (kDa). Carril 2: Epitelio corneal con plasminógeno (3.9×10^{-3} M). Carril 3: Control del epitelio corneal (incubado 0 h). Carril 4: Plasminógeno (3.9×10^{-3} M). Carril 5: Epitelio corneal. Carril 6: Epitelio corneal con plasminógeno (1.9×10^{-3} M). Carril 7: Epitelio corneal con plasminógeno (9.7×10^{-4} M). Carril 8: Epitelio corneal con plasminógeno (4.8×10^{-4} M). Carril 9: Epitelio corneal con plasminógeno (2.4×10^{-4} M).

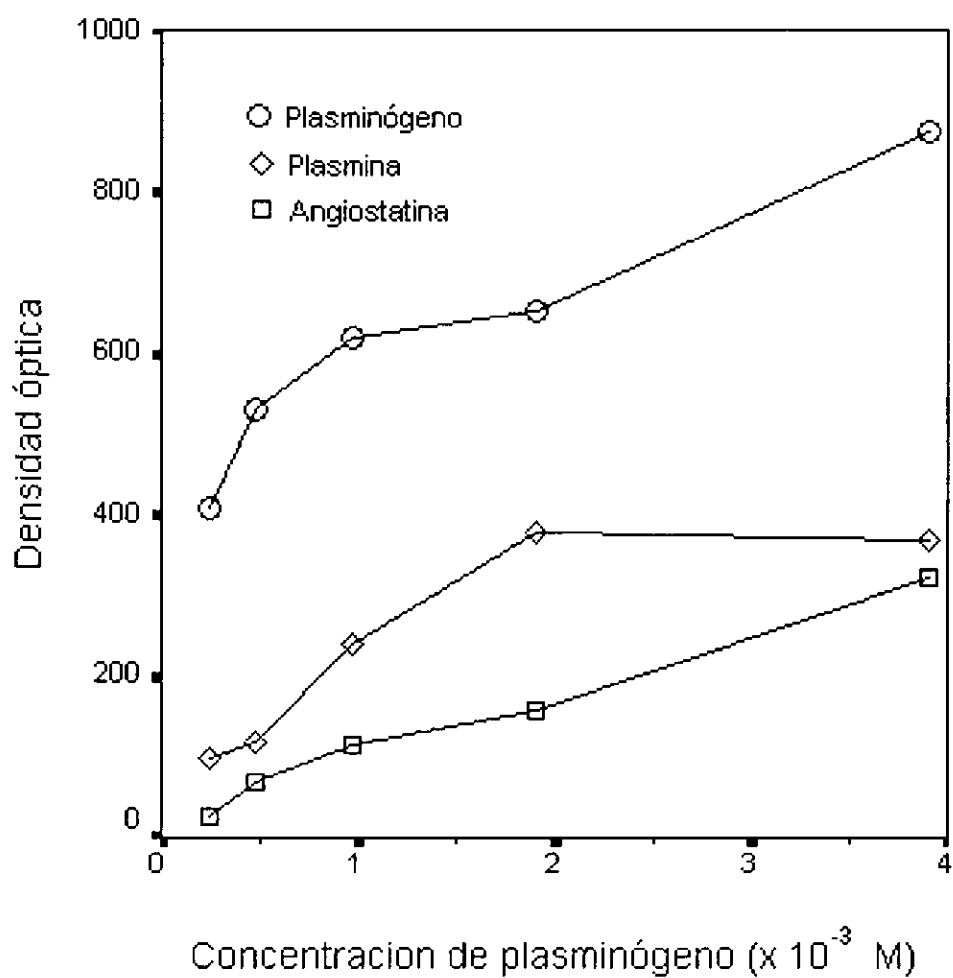


Figura 3. Análisis densitométrico de la electrotransferencia (Fig. 2) de las incubaciones del epitelio corneal del ratón silvestre con diferentes concentraciones de plasminógeno humano durante 12 h. Se observa un aumento en la densidad óptica del plasminógeno, la plasmina y la angiostatina conforme aumenta la concentración de plasminógeno.

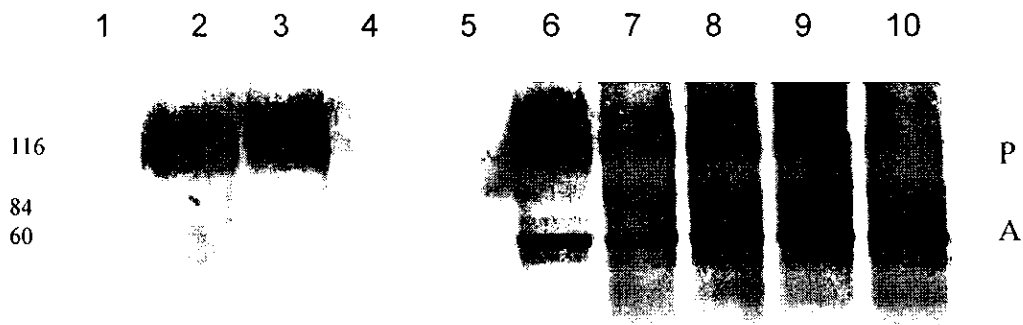


Figura 4. Análisis de electrotransferencia que muestra la expresión de plasminógeno y angiostatina al incubarse a 37°C con epitelio corneal de ratón silvestre durante 6, 12, 24 y 48 h. En cada carril se aplicó 3.3 μg de tejido epitelial con una razón de 1:20 (plasminógeno:tejido epitelial) y plasminógeno (3.9×10^{-3} M). El anticuerpo primario utilizado fue: policlonal anti-K1-K3 plasminógeno humano originado en conejo, se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario y se reveló con 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato/nitroazul cloruro de tetrazolio. Carril 1: Marcador de peso molecular (kDa). Carril 2: Plasminógeno no incubado. Carril 3: Plasminógeno incubado durante 24 h. Carril 4: Epitelio corneal incubado durante 24 h. Carril 5: Control del epitelio corneal (incubado 0 h). Carril 6: Control del epitelio corneal con plasminógeno (incubados 0 h). Carril 7: Epitelio corneal con plasminógeno incubados durante 6 h. Carril 8: Epitelio corneal con plasminógeno incubados durante 12 h. Carril 9: Epitelio corneal con plasminógeno incubados durante 24 h. Carril 10: Epitelio corneal con plasminógeno incubados durante 48 h. P = Plasminógeno (116kDa), A = Angiostatina

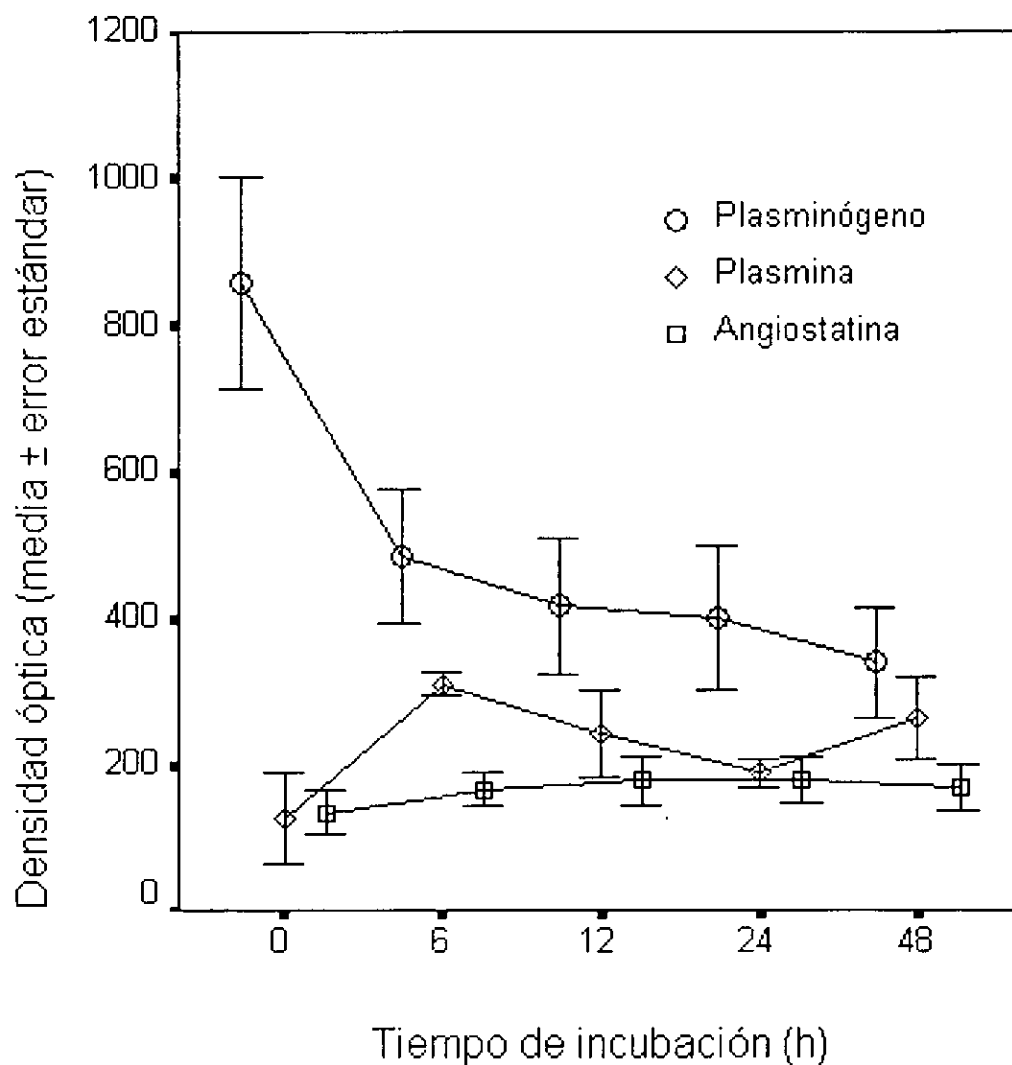


Figura 5. Análisis densitométrico de la digestión de plasminógeno humano y la producción de angiostatina y plasmina por células del epitelio corneal de ratón silvestre después de la incubación a 37°C en el curso del tiempo (Fig. 4). La gráfica muestra la media y el error estándar de la densidad óptica obtenida de 3 experimentos.

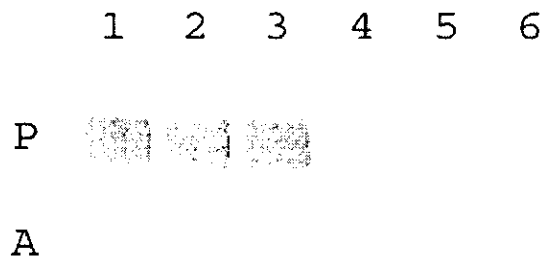


Figura 6. Análisis de electrotransferencia de las incubaciones del plasminógeno y epitelio corneal de ratón silvestre a través del tiempo. En todos los carriles se aplicaron 3.3 μg de epitelio corneal o plasminógeno (3.9×10^{-3} M). Carril 1: Plasminógeno incubado durante 6 h. Carril 2: Plasminógeno incubado durante 12 h. Carril 3: Plasminógeno incubado durante 48 h. Carril 4: Epitelio corneal incubado durante 6 h. Carril 5: Epitelio corneal incubado durante 12 h. Carril 6: Epitelio corneal incubado durante 48 h. (Ver Fig. 4, carriles 3 y 4 para incubación de 24 h). P = Plasminógeno, A = Angiostatina.

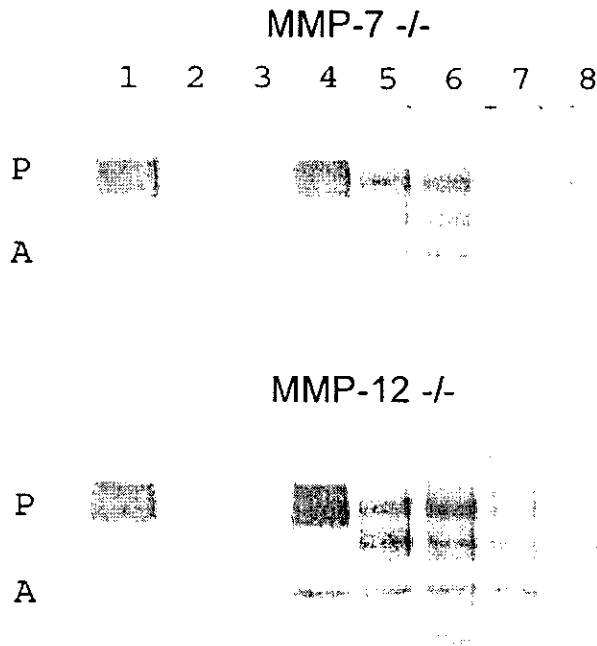


Figura 7. Análisis de electrotransferencia del epitelio corneal de ratones transgénicos para MMP-7 y -12 incubados con plasminógeno humano a diferentes tiempos. En todos los carriles se aplicaron 3.3 μg de tejido epitelial y/o plasminógeno 3.9×10^{-3} M. Carril 1: Control de plasminógeno (incubación 0 h). Carril 2: Control del epitelio corneal (incubación 0 h). Carril 3: Epitelio corneal incubado durante 24 h. Carril 4: Epitelio corneal con plasminógeno NO incubado. Carril 5: Epitelio corneal con plasminógeno incubado durante 6 h. Carril 6: Epitelio corneal con plasminógeno incubado durante 12 h. Carril 7: Epitelio corneal con plasminógeno incubado durante 24 h. Carril 8: Epitelio corneal con plasminógeno incubado durante 48 h.

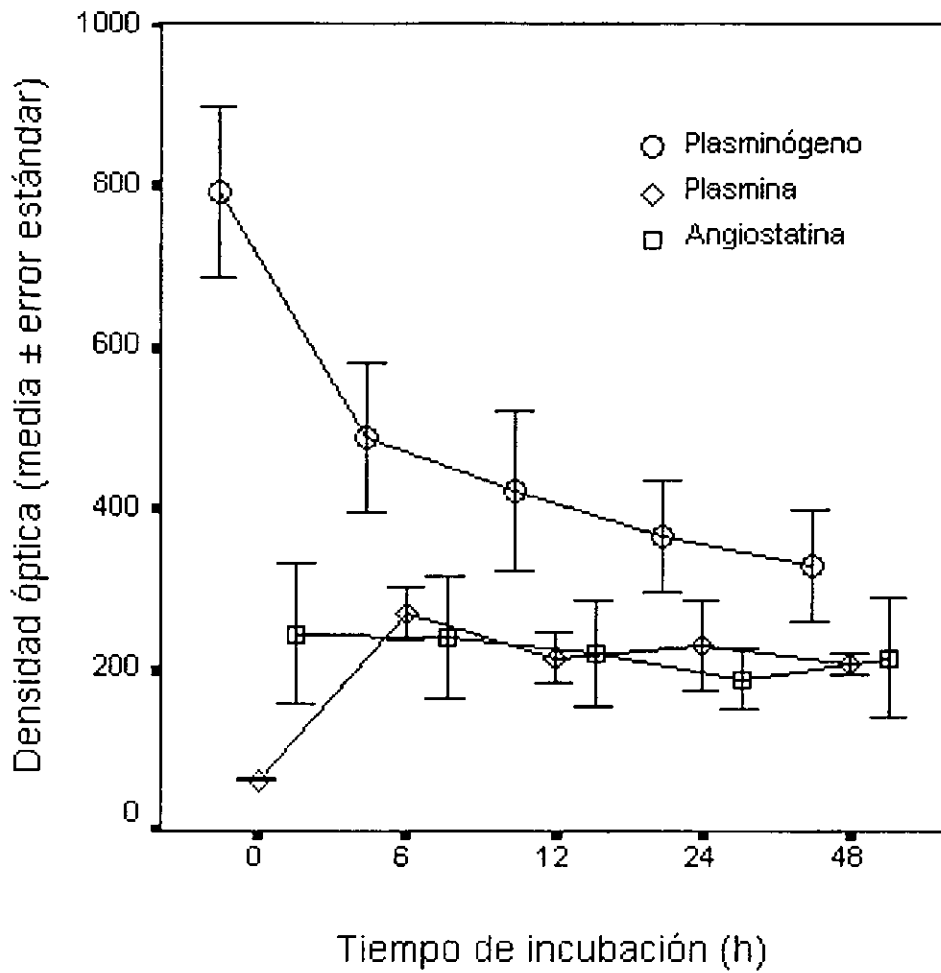


Figura 8. Análisis densitométrico de la digestión de plasminógeno humano y la producción de angiostatina y plasmina por células del epitelio corneal de ratón transgénico para MMP-7, después de la incubación a 37°C en el curso del tiempo (Fig. 7). La gráfica muestra la media y el error estándar de la densidad óptica obtenida de 3 experimentos.

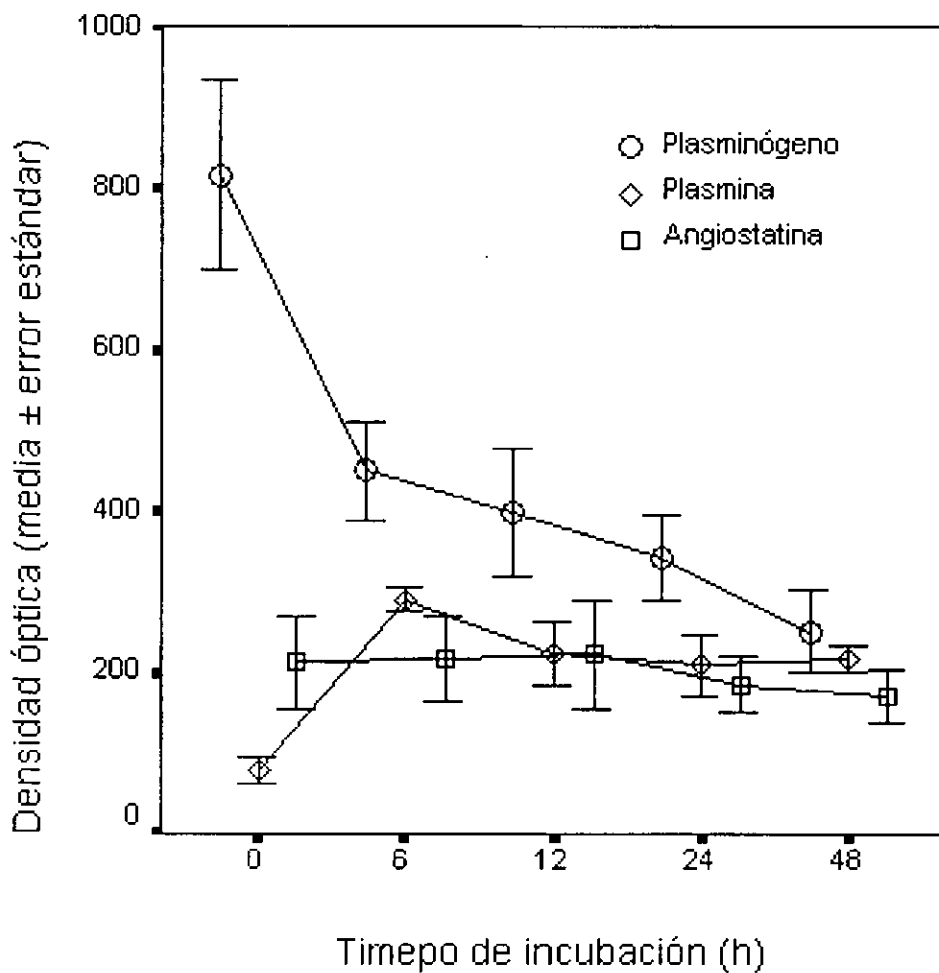


Figura 9. Análisis densitométrico de la digestión de plasminógeno humano y la producción de angiostatina y plasmina por células del epitelio corneal de ratón transgénico para MMP-12, después de la incubación a 37°C en el curso del tiempo (Fig. 7). La gráfica muestra la media y el error estándar de la densidad óptica obtenida de 3 experimentos.

1 2 3 4 5 6

P

A

Figura 10. Análisis de electrotransferencia de las incubaciones del epitelio corneal de ratones transgénicos para MMP-7 (carriles 1 a 3) y MMP-12 (carriles 4 a 6) a diferentes tiempos de incubación. No se utilizó plasminógeno humano. En todos los carriles se aplicaron 3.3 μ g de epitelio corneal. Carriles 1 y 4: 6 h. Carriles 2 y 5: 12 h. Carriles 3 y 6: 48 h (Ver Fig. 7, carril 3 para incubación de 24 h). P = Plasminógeno, A = Angiostatina

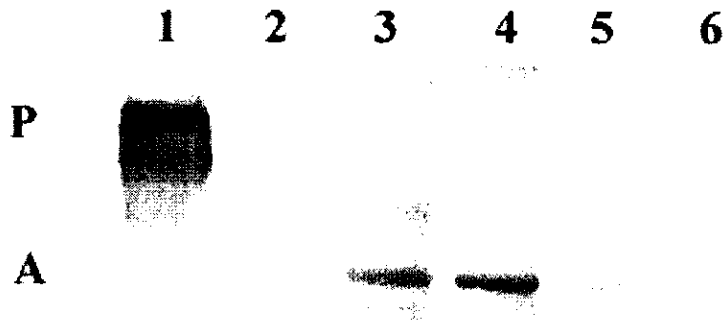


Figura 11. Análisis de electrotransferencia en el que se observa la degradación de plasminógeno (P) y los niveles de angiostatina (A) por el epitelio corneal de ratón silvestre en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor sintético de MMPs (SIMP). En todos los carriles se aplicaron 3.3 μg de tejido epitelial y/o plasminógeno humano (3.9×10^{-3} M). Todas las incubaciones se realizaron durante 48 h. Carril 1: Plasminógeno. Carril 2: Epitelio corneal con plasminógeno. Carril 3: Epitelio corneal con plasminógeno y 2.5×10^{-4} M SIMP. Carril 4: Epitelio corneal con plasminógeno y 5×10^{-4} M SIMP. Carril 5: Epitelio corneal con plasminógeno y 7.5×10^{-4} M SIMP. Carril 6: Epitelio corneal con plasminógeno y 10×10^{-3} M SIMP.

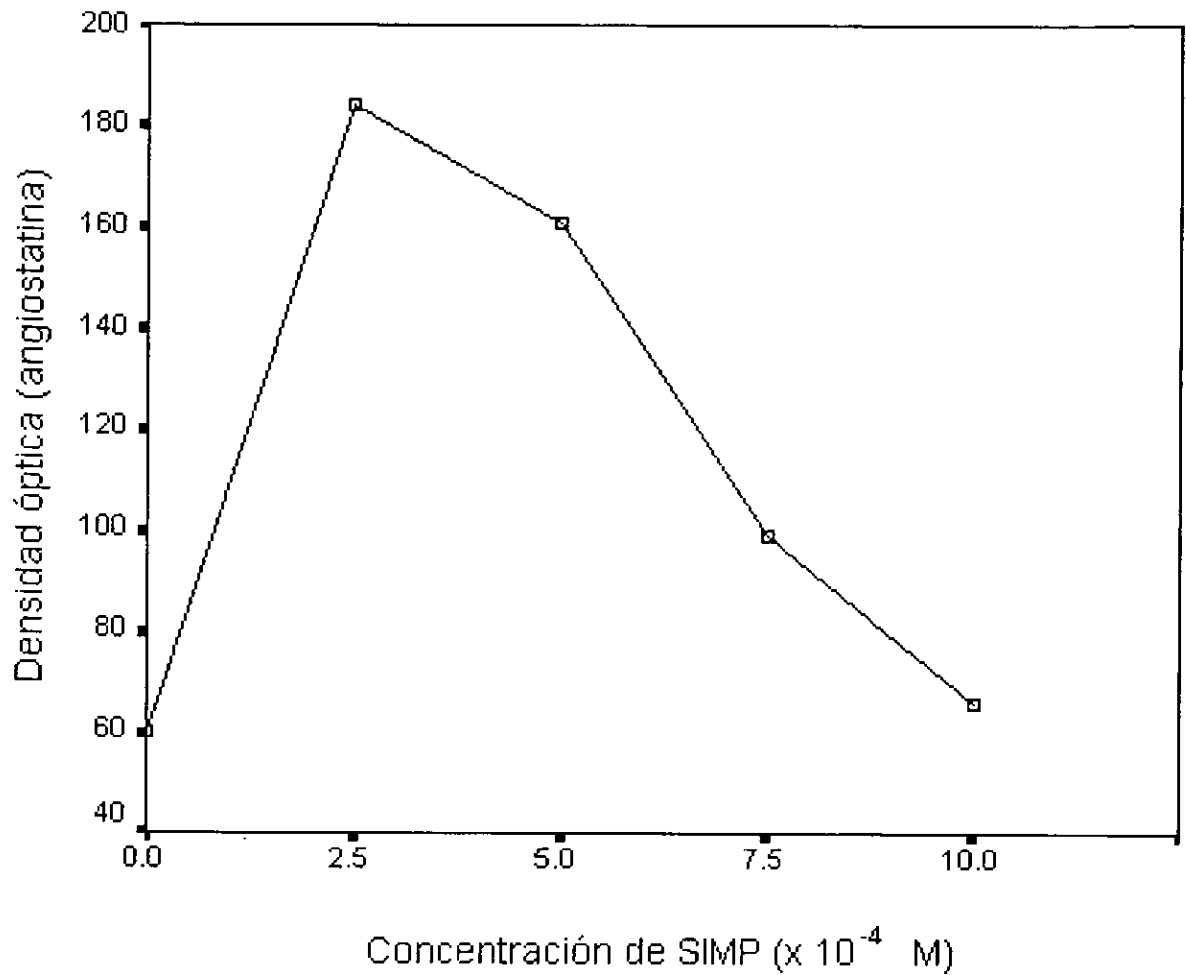


Figura 12. Análisis densitométrico de la electrotransferencia (Fig. 2) de las incubaciones del epitelio corneal del ratón silvestre con diferentes concentraciones del inhibidor sintético de MMP (SIMP) durante 48 h. Se observa una disminución en la densidad óptica del plasminógeno, la plasmina y la angioestatina conforme aumenta la concentración de SIMP.

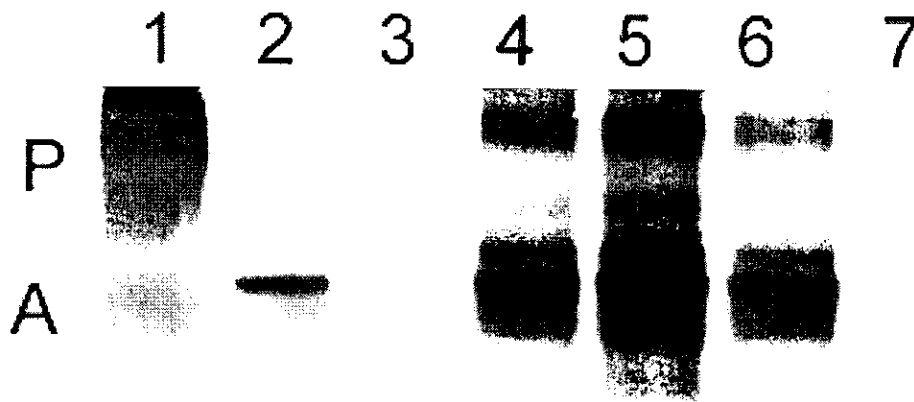


Figura 13. Análisis de electrotransferencia en el que se observa la degradación de plasminógeno (P) y los niveles de angiostatina (A) por el epitelio corneal de ratón silvestre en presencia de diferentes concentraciones de ácido- ϵ -amino-n-caproico (ϵ -ACA). En todos los carriles se aplicó 3.3 μ g de tejido epitelial y/o plasminógeno humano (3.9×10^{-3} M) y se incubaron durante 48 h. Carril 1: Plasminógeno. Carril 2: Epitelio corneal con plasminógeno. Carril 3: Epitelio corneal con plasminógeno y 7.5 μ M ϵ -ACA. Carril 4: Epitelio corneal con plasminógeno y 15 μ M ϵ -ACA. Carril 5: Epitelio corneal con plasminógeno y 22.5 μ M ϵ -ACA. Carril 6: Epitelio corneal con plasminógeno y 30 μ M ϵ -ACA. Carril 7: ϵ -ACA en ausencia de epitelio corneal.

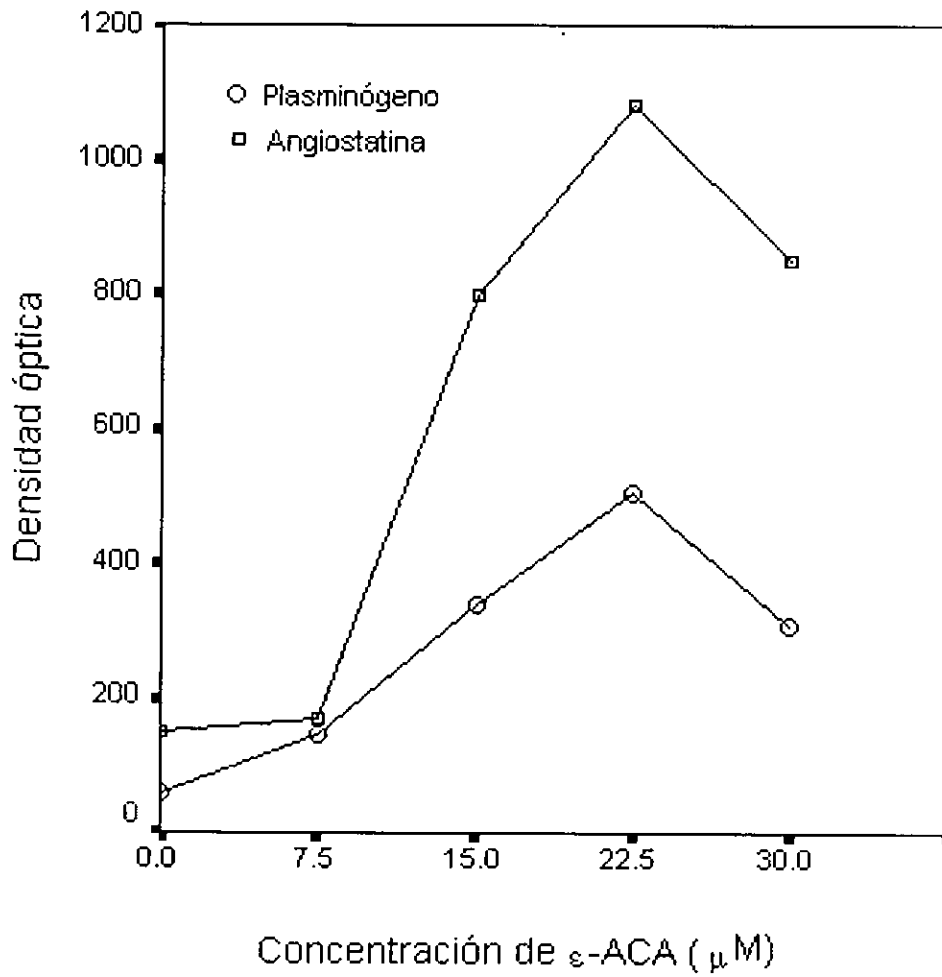


Figura 14. Análisis densitométrico de la electrotransferencia (Fig. 13) de las incubaciones del epitelio corneal del ratón silvestre con diferentes concentraciones de ϵ -ACA durante 48 h. Se observa un aumento en la densidad óptica del plasminógeno, la plasmina y la angiostatina conforme aumenta la concentración de ϵ -ACA.

Abreviaturas

aFGF	Factor de crecimiento ácido de fibroblasto
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblasto
CD105	Endoglina
ϵ -ACA	ϵ -ácido-amino-caproico
FSD	Donadores de sulfidrilos libres
MMP	Metaloproteasas
PECAM-1	Molécula de adhesión celular endotelial-plaquetas
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIMP	Inhibidor sintético de metaloproteasa
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasa
tPA	Activador tisular de plasminógeno
uPA	Uroquinasa
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial