



Universidad Nacional Autónoma de México

---

Instituto de Neurobiología

Análisis del mecanismo del efecto inhibitorio de las vaso-inhibinas  
sobre la proliferación endotelial inducida por la bradicinina:  
implicación del óxido nítrico

Tesis

Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

P r e s e n t a

Q.F.B. David Arredondo Zamarripa

Directora de Tesis

Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez

Dra. Stéphanie Thebault



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: David Arredondo Zamarripa, cuyo título es: “Análisis del mecanismo del efecto inhibitorio de las vasoinhibinas sobre la proliferación endotelial inducida por la bradicinina: implicación del óxido nítrico” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Secretario

Dra. Stéphanie Thebault

Vocal

Dr. José Vázquez Prado

Suplente

Dr. Gerardo Rojas Piloni

Suplente

Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas

Aprobado por el Comité Académico

---

Dra. Teresa Morales Guzmán  
Coordinadora del Programa  
Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez y de la Dra. Stéphanie Thebault.

## Resumen

Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados de la prolactina, capaces de reducir la vasopermeabilidad retiniana asociada a la diabetes y antagonizar el efecto vasorelajante de la bradicidina (BK), hormona que se ha encontrado sobreactivada en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa. Se sabe también que la BK promueve la proliferación endotelial. El objetivo de este trabajo fue analizar los mecanismos a través de los cuales las vasoinhibinas pueden bloquear el aumento de la proliferación celular inducida por la BK, en cultivos de células endoteliales de la vena umbilical de bovino (BUVEC).

Las vasoinhibinas inhiben la activación de la fosfolipasa C, la producción de inositol trifosfato ( $IP_3$ ), y la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico inducidas por la BK. Las vasoinhibinas también interfieren en la actividad de la sintetasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) dependiente de la BK, al impedir su fosforilación en el residuo de serina 1179, inhibiendo la producción de óxido nítrico (NO). La inhibición de la producción de NO puede mediar el efecto anti-proliferativo de las vasoinhibinas dado que donadores de NO, como el DET-ANONOato, previenen el efecto inhibitorio de las vasoinhibinas sobre la proliferación endotelial inducida por la BK. Nuestros datos sugieren la siguiente cascada de señalización intracelular: las vasoinhibinas bloquean el efecto de la BK sobre la activación de la fosfolipasa C, la liberación del  $Ca^{2+}$  intracelular mediada por el  $IP_3$  y la fosforilación de la eNOS, y por lo tanto, le impiden a la BK el estimular la proliferación endotelial.

## Summary

Vasoinhibins are a family of prolactin derived peptides that reduce excessive retinal vasopermeability associated with diabetes. Vasoinhibins antagonize the vasorelaxing effect of bradykinin (BK), a factor found to be overactivated in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. As BK also promotes endothelial cell proliferation, we here study how vasoinhibins could block BK-induced increase of bovine umbilical vein endothelial cell (BUVEC) proliferation.

Vasoinhibins inhibit BK-induced activation of phospholipase C, inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) production, and Ca<sup>2+</sup> release from endoplasmic reticulum. Vasoinhibins also inactivate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in presence of BK preventing its phosphorylation at Ser1179. Inhibition of eNOS activity may mediate the anti-angiogenic action of vasoinhibins, since the NO donor DET-ANONOate prevents vasoinhibins from blocking BK-induced proliferation of BUVEC. Our data support the subsequent intracellular signaling pathway: vasoinhibins prevent BK-induced phospholipase C activation, IP<sub>3</sub>-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> store release, eNOS activity, and thereby, BUVEC proliferation.

## **Agradecimientos**

Deseo agradecer al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad realizar mis estudios de Maestría. A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (Cuenta No: 509003120) así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario No: 269268) por el apoyo económico.

Deseo agradecer a la Dra. Carmen Clapp por la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo así como por la asesoría en este proyecto, a la Dra. Stéphanie Thebault por la constante asesoría y por sus consejos. Al comité tutorial integrado por el Dr. Gerardo Rojas Piloni y el Dr. Rogelio Arellano Ostoa por sus observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

También agradezco a la Dra. Celina García Meléndrez por la asesoría y apoyo en el trabajo experimental. Agradezco el apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera y a los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán. Agradezco el apoyo administrativo de la M. en C. Leonor Casanova Rico, responsable de la unidad de enseñanza.

Por último quiero agradecer a las siguientes personas con las que compartí esta experiencia que sin duda va más allá del aspecto académico, gracias a Mariana, Lenin, Ximena, Angélica, Celina, Candy, Irma, Norma, Diana, Chikis, Claudia, Mayda, Minerva, Milene, Pepe, Mario, Lalo, Benjas, Alberto.

## **Dedicatoria**

Esta Tesis se la dedico a mis padres, Felipe de Jesús Arredondo Cortes y Noemi Zamarripa Rodríguez, y a mis hermanos Felipe, Omar, Nohemi y Abraham

## Índice

Resumen	iv
Summary	v
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 La angiogénesis	2
2.1.1 Regulación en condiciones fisiológicas	3
2.1.1.1 Factores proangiogénicos: VEGF y bradicidina	5
2.1.1.2 Factores antiangiogénicos: las vasoinhibinas	8
2.1.2 Consecuencia del desbalance entre factores pro- y antiangiogénicos: enfermedades angiogénesis-dependientes	10
2.1.2.1 Implicación del VEGF y de la bradicidina en la retinopatía diabética	11
2.1.2.2 Papel de las vasoinhibinas en la retinopatía diabética: relevancia terapéutica	12
2.2. El óxido nítrico: regulador esencial de la angiogénesis	
2.2.1 Generalidades	12
2.2.2 Regulación de la activación de la sintetasa endotelial de óxido nítrico	13
3. Planteamiento del problema	16
4. Hipótesis	16
5. Objetivo	16

5.1 Objetivos específicos	16
6. Materiales y métodos	17
6.1 Cultivos celulares	17
6.2 Ensayo de proliferación	17
6.3 Evaluación de la actividad de la fosfolipasa C <i>in vitro</i>	17
6.4 Evaluación de la expresión y fosforilación de eNOS	18
6.5 Evaluación de NO <i>in vitro</i>	19
6.6 Análisis estadístico	18
7. Resultados	
7.1 Las vasoinhibinas inhiben la proliferación de células endoteliales BUVEC, estimuladas con bradicinina, de manera dosis-dependiente	19
7.2 El efecto de las vasoinhibinas sobre la proliferación celular inducida por bradicinina involucra la producción de óxido nítrico	20
7.3 Las vasoinhibinas bloquean la vía clásica de señalización de la bradicinina a nivel de la actividad de la fosfolipasa C y de la producción de inositol trifosfato en las células endoteliales BUVEC	21
7.4 Efecto de las vasoinhibinas sobre la fosforilación de la sintetasa endotelial de óxido nítrico, inducida por la bradicinina en células endoteliales BUVEC	23
8. Discusión	25
9. Conclusiones	29
10. Referencias	30
11. Índice de figuras y tablas	39

## 1. Introducción

Las vasoinhibinas (Vi) son una familia de péptidos formados a partir de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL), por enzimas como la catepsina D y varias metaloproteasas (Clapp *et al.*, 2006). La importancia fisiológica de las Vi radica en sus propiedades antiangiogénicas, es decir previenen la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, proceso conocido como angiogénesis. La angiogénesis es esencial durante el desarrollo fetal y ocurre de manera muy restringida en el adulto durante el ciclo reproductivo de la mujer y la reparación de tejidos. Sin embargo, la falta de regulación de dicho proceso contribuye al desarrollo de distintas enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide (Gupta and Zhang, 2005; Clapp *et al.*, 2006) y las retinopatías vasoproliferativas como son la retinopatía del prematuro, la degeneración macular asociada con la edad y la retinopatía diabética (Campochiaro, 2000). Actualmente la fotocoagulación con láser y la vitrectomía son los tratamientos más efectivos contra las retinopatías vasoproliferativas; sin embargo, estas terapias por sí mismas pueden generar pérdida de la agudeza y del campo visual (Bloomgarden, 2007; Gardner and Antonetti, 2007). Se han propuesto otras estrategias dirigidas contra factores que promueven la angiogénesis, como la inyección intravítreal de anticuerpos monoclonales en contra del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Simo *et al.*, 2002). Es en este sentido, que el uso de factores endógenos capaces de inhibir la angiogénesis ocular se presenta como una opción promisoriosa para el tratamiento de las retinopatías vasoproliferativas.

En pacientes con retinopatía diabética, además de encontrar un incremento en la concentración intravítreal del VEGF, recientemente se observó un incremento de la concentración intravítreal de la bradicinina (BK) (Gao *et al.*, 2007). Tanto el VEGF como la BK promueven la vasopermeabilidad y la proliferación de células endoteliales, eventos que pueden ser regulados a través de la producción de óxido nítrico (NO) por la enzima sintetasa endotelial de NO (eNOS). Las Vi inhiben la proliferación de células endoteliales y la producción de NO inducido por VEGF, al promover la desfosforilación de la eNOS (Clapp *et al.*, 2009). Asimismo, resultados preliminares del laboratorio muestran que las Vi bloquean la proliferación de células endoteliales inducida por BK. No obstante, no se conocen los mecanismos intracelulares por los cuales se genera este efecto. Por lo tanto, en este proyecto nos planteamos analizar los mecanismos celulares por los cuales las Vi inhiben

la proliferación endotelial inducida por BK, enfocándonos en la regulación de la producción de NO por la eNOS.

A continuación se revisarán aspectos generales sobre la angiogénesis y su regulación por factores pro- y antiangiogénicos tanto en un contexto fisiológico como en la retinopatía diabética. Nos enfocamos particularmente en el VEGF, la BK y las Vi. También, se revisará la participación del NO como regulador de la angiogénesis.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. La angiogénesis**

Los vasos sanguíneos son responsables del aporte de oxígeno y nutrientes a los diferentes órganos y tejidos; así mismo, juegan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario modulando la morfogénesis de los órganos (Carmeliet, 2005). En el embrión se distinguen dos procesos por los cuales se genera el crecimiento de los vasos sanguíneos; el primero de ellos es a partir de células mesodermales o precursores de células endoteliales, que migran a zonas avasculares formando una red primitiva de vasos sanguíneos, proceso denominado vasculogénesis (Risau, 1997). Posteriormente se presenta el proceso de angiogénesis, en el cual a partir de vasos sanguíneos preexistentes se generan nuevos brotes vasculares que se ramifican en brotes más pequeños. Estos brotes forman nuevos túbulos de células endoteliales para dar finalmente lugar a una compleja red vascular (Jain, 2003). Cabe mencionar brevemente las diferentes etapas de la angiogénesis (Figura 1): se inicia por desestabilización de los vasos sanguíneos caracterizada por un incremento de su permeabilidad y vasodilatación. Posteriormente, las células endoteliales migran y proliferan formando nuevos brotes vasculares, los cuales avanzan a través de la matriz extracelular hasta encontrarse con otros brotes y fusionarse a través de vacuolas, para formar túbulos de células endoteliales (Kamei *et al.*, 2006). Finalmente, estos nuevos vasos sanguíneos se estabilizan al ser recubiertos por pericitos en el caso de la microvasculatura o por células de músculo liso para la macrovasculatura, proporcionándoles estabilidad y capacidad de constricción/dilatación. En este punto el nuevo vaso sanguíneo se vuelve funcional y se restablece el flujo sanguíneo (Kamei *et al.*, 2006).

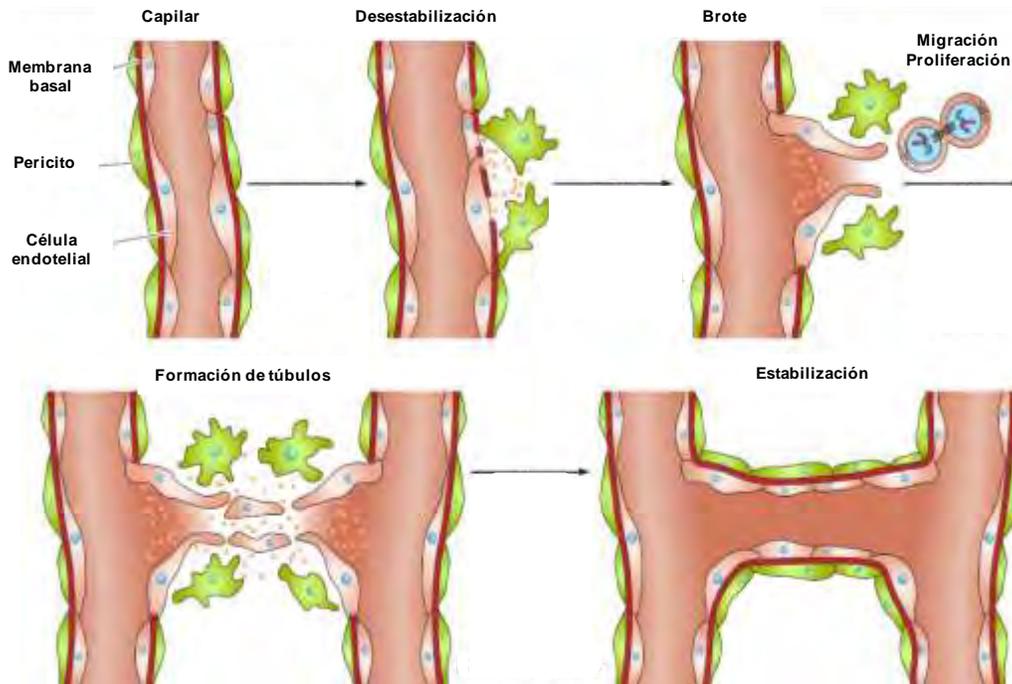


Figura 1. Ilustración de las etapas necesarias para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos: desestabilización de los capilares, generación de brotes vasculares, ramificación y estabilización (modificado de Clapp *et al.* 2009).

### 2.1.1 Regulación en condiciones fisiológicas

En el adulto la formación de vasos sanguíneos se lleva a cabo principalmente por el proceso angiogénico. Dicho proceso es muy limitado y estrictamente regulado por el balance entre factores estimuladores e inhibidores, conocidos como factores pro- y antiangiogénicos respectivamente.

La angiogénesis en el adulto ocurre durante el ciclo reproductivo de la mujer y la reparación de tejidos, y este proceso se inicia tras un incremento de los factores proangiogénicos. El incremento en la expresión de factores proangiogénicos se genera en respuesta a distintos estímulos: en el caso del ciclo ovárico, el incremento de las hormonas sexuales esteroideas, estrógenos y progesterona, promueve la expresión de factores proangiogénicos como el VEGF (Losordo and Isner, 2001). Durante el embarazo, el útero y la placenta secretan hormonas, como la hormona coriónica humana y el lactógeno placentario, y factores proangiogénicos, como el VEGF que contribuyen a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Zygmunt *et al.*, 2003; Clapp *et al.*, 2009). Por otra parte, cuando

existe una agresión a los tejidos se presenta una reacción inflamatoria; los macrófagos reclutados secretan una gran cantidad de citocinas y factores de crecimiento, como el factor transformante beta (TGF- $\beta$ ), el VEGF, entre otros, que contribuyen a la reparación del tejido (Groothuis, 2005; Velnar *et al.*, 2009). El daño al tejido puede incluir daño a la vasculatura, lo que genera una disminución en el riego sanguíneo y de los niveles de oxígeno (hipoxia) (Velnar *et al.*, 2009). La hipoxia resulta en uno de los estímulos proangiogénicos más potentes, al estar conectado de manera directa el riego sanguíneo a las necesidades metabólicas. En condiciones normales, las células reciben el oxígeno que se difunde del torrente sanguíneo, cuando un tejido se encuentra por arriba del límite de difusión de oxígeno se genera hipoxia. La hipoxia estimula el crecimiento de vasos a través de promover e inhibir la expresión de factores proangiogénicos y antiangiogénicos respectivamente, mediante la estimulación de factores de transcripción inducibles por la hipoxia (Pugh and Ratcliffe, 2003; Duenas *et al.*, 2004; Dhanabal and Sethuraman, 2006; Wang *et al.*, 2009).

Existe una amplia variedad de factores proangiogénicos de diferente naturaleza, podemos mencionar factores de crecimiento como el VEGF, el TGF- $\beta$ , el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), las angiopietinas 1 y 2 (Ang-1/2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), entre otros (Carmeliet, 2005). También existen factores proangiogénicos de tipo hormonal como los estrógenos, la progesterona, la prolactina, la hormona de crecimiento, la BK, entre otros (Chen *et al.*, 2009). Es esencial mencionar que tras la acción de los factores proangiogénicos, se generan nuevos túbulos vasculares que restablecen los niveles oxígeno, lo que disminuye la expresión de factores proangiogénicos reduciendo el estímulo angiogénico. La participación de una gran cantidad de factores antiangiogénicos endógenos en este punto, es necesaria para concluir la formación de los nuevos vasos (Nyberg *et al.*, 2005). Al igual que los factores proangiogénicos, existe una amplia variedad de factores antiangiogénicos de distinta naturaleza. Notablemente, muchos factores antiangiogénicos resultan del procesamiento proteolítico de distintos precursores como hormonas (como las Vi), componentes de la matriz extracelular (como la trombospondina) o de componentes del sistema de coagulación (como el cininogeno de alto peso molecular activado) (Mott and Werb, 2004). En la tabla 1 se muestran algunos factores pro- y antiangiogénicos.

Factores proangiogénicos	Factores antiangiogénicos
Factores de crecimiento	Factores de crecimiento y citocinas
Factor de crecimiento endotelial vascular	Factor derivado del epitelio pigmentario
Factor de crecimiento de fibroblastos	Factor plaquetario 4
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Interferon alfa, beta, gama
Factor de crecimiento tipo insulina 1	Interleucina 8, 10, 12
Factor de crecimiento transformante $\beta$	
Angiopietina 1 y 2	Hormonas
Hormonas	Angiotensinógeno
Estrógenos	Ghrelina
Prolactina	Hormona liberadora de gonadotropinas
Lactógeno placentario	Somatostatina
Hormona de crecimiento	Vasoinhibinas
Angiotensina 2	Derivados de la matriz extracelular
Insulina	Trombospondina
Leptina	Endostatina
Calcitonina	Tumstatina
Vasopresina	Fragmentos de fibronectina
Bradicinina	Otros
Otros	Receptor soluble del VEGF
Factor de necrosis tumoral	Inhibidores de metaloproteasas de matriz
Ciclooxigenasa	Arrestina
Óxido nítrico	
Metaloproteasas	
Quimiocinas	

Tabla 1. Algunos factores pro- y antiangiogénicos

A continuación se presentará el papel y las acciones de dos factores proangiogénicos, el VEGF y la BK, y de una familia de factores antiangiogénicos, las Vi, en un contexto fisiológico.

### 2.1.1.1 Factores proangiogénicos: VEGF y BK

Uno de los factores proangiogénicos más potente es el VEGF (Ferrara *et al.*, 2003); fue descrito inicialmente por su capacidad de inducir vasopermeabilidad, pero hoy se sabe que es un potente mitógeno clave en el desarrollo de la vasculatura, ya que la falta de este factor en ratones genera un desarrollo anormal en la vasculatura y embriones no viables (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). Es por esto que el VEGF ha sido objeto de una amplia investigación desde su descubrimiento en 1989, la cual ha arrojado importante información que será brevemente mencionada a continuación.

La familia del VEGF consta de diversas glicoproteínas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, de las cuales el VEGF-A ha sido el más estudiado. El procesamiento alternativo del mRNA del VEGF-A genera distintas isoformas: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, y VEGF<sub>206</sub>, donde el subíndice hace referencia al número de aminoácidos. La isoforma de 165 aminoácidos es la más abundante e importante regulando la angiogénesis; es por ello que lo referido hasta aquí y lo que se mencionará a lo largo del escrito, se refiere al VEGF-A<sub>165</sub>.

El VEGF modula sus efectos a través de una familia de receptores con dominio de tirosina-cinasa. El receptor VEGFR-2 (KDR/Flk-1) se considera como el más importante en la regulación de la angiogénesis en el adulto; al unirse el VEGF a este receptor, se activan distintas vías de señalización como la vía de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K)/Akt que participa en la fosforilación de la eNOS, entre otras funciones (Ferrara *et al.*, 2003). Otra vía que se activa es la de la fosfolipasa C  $\gamma$ , la cual promueve la movilización de calcio intracelular (D'Angelo *et al.*, 1995). Existen otros receptores para el VEGF como el receptor VEGFR-1 (Flt-1), cuyo papel fisiológico aún está poco claro. Se sabe que regula la migración endotelial *in vitro* y cada vez existe más evidencia de su participación como regulador negativo del VEGFR-2, a través de una isoforma soluble (D'Angelo *et al.*, 1995; Fukumura *et al.*, 2001; Ferrara *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito otra isoforma, el receptor VEGFR-3, el cual participa principalmente en el desarrollo embrionario y en la linfangiogénesis (Fukumura *et al.*, 2001).

El VEGF mantiene la integridad de la vasculatura existente y promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos, al modular múltiples procesos en las células endoteliales. Por ejemplo, el VEGF incrementa la vasopermeabilidad, lo que promueve la desestabilización del endotelio, evento necesario para el inicio de la angiogénesis (Fukumura *et al.*, 2001). El VEGF también promueve la proliferación de las células endoteliales (ras/raf/MAP cinasas) y activa vías antiapoptóticas (PI3K/Akt) (Zachary and Glicki, 2001). Otro fenómeno clave que modula el VEGF, es la migración de las células endoteliales, ya que el VEGF induce la expresión de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular y la membrana basal (Zachary and Glicki, 2001). Asimismo, el VEGF promueve la migración al modificar tanto la expresión como la distribución de proteínas de adhesión y del citoesqueleto de las células endoteliales (Lee *et al.*, 2010). Además, el

VEGF induce la expresión génica de otros factores proangiogénicos como la Ang-2 (Oh *et al.*, 1999). Es por todo esto que se le considera como el principal regulador de la angiogénesis (Fukumura *et al.*, 2001). La relevancia funcional del VEGF se ilustra particularmente en el ciclo ovulatorio, durante el cual, un incremento en los niveles intrafolículos de VEGF en la primera fase del ciclo, con un máximo antes del inicio de la fase lútea, dispara la formación de nuevos vasos. Subsecuentemente la regresión vascular durante la atresia folicular se debe a la reducción de los niveles de VEGF (en conjunto con el incremento de factores antiangiogénicos) hasta el próximo ciclo (Geva and Jaffe, 2000). La variación altamente regulada y recurrente de los niveles de VEGF a lo largo del ciclo ovulatorio refleja la importancia fisiológica del balance entre factores pro- y antiangiogénicos.

Otro factor proangiogénico importante es la BK, la cual se genera a partir del sistema calicreína-cininas, que está constituido por tres proteínas: el factor de coagulación XII, la precalicreína y el cininógeno de alto peso molecular. El corte proteolítico del cininógeno de alto peso molecular por la calicreína (producto de la precalicreína), produce a la BK, un nonapéptido conocido como potente mediador inflamatorio capaz de inducir vasodilatación e incrementar la vasopermeabilidad (Morbidelli *et al.*, 1998). Asimismo, la BK posee propiedades proangiogénicas al estimular la proliferación y formación de túbulos vasculares y al incrementar la sobrevivencia de células endoteliales. Este factor es capaz de inducir angiogénesis en modelos animales como la córnea de conejo (Parenti *et al.*, 2001), y la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (Colman *et al.*, 2003), entre otros. También se ha demostrado que en ratas deficientes del cininógeno de alto peso molecular (ratas BN-Ka), precursor de la BK, existe una menor respuesta proangiogénica en el modelo de implante de esponja (Hayashi *et al.*, 2002).

La BK actúa a través de dos receptores acoplados a proteínas G conocidos como B1 y B2; el receptor B2 se expresa constitutivamente mientras que el receptor B1 incrementa su expresión tras daño tisular, isquemia e inflamación (Ahluwalia and Perretti, 1999). Ambos receptores activan la misma vía de señalización; sin embargo, B1 es menos sensible a la desensibilización y se activa con otros metabolitos del sistema calicreína-cininas (Ahluwalia and Perretti, 1999), características por las cuales se considera el mediador de los efectos proangiogénicos de la BK. Los receptores de la BK, al activarse conducen a un

incremento en la concentración de calcio citosólico, lo que promueve la activación de eNOS vía su unión al complejo calcio-calmodulina (Busse and Mulsch, 1990). La movilización de calcio se lleva a cabo por la activación de la enzima fosfolipasa C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ), que degrada al fosfatidilinositoldifosfato (PIP<sub>2</sub>) presente en la membrana celular en inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) (Parenti *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2003). El IP<sub>3</sub> se une a sus receptores en el retículo endoplásmico liberando el calcio ahí almacenado, mientras que el DAG promueve la activación de canales membranales como los canales catiónicos no selectivos de tipo TRP (“Transient Receptor Potential”) que contribuyen al influjo de calcio de origen extracelular (Schilling *et al.*, 1989; Nilius and Droogmans, 2001; Leung *et al.*, 2006). La activación de los receptores de BK, también promueve la activación de la eNOS por fosforilación del residuo de serina 1177; esta fosforilación puede ser por la activación de la cinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMKII) y a través de la vía PI3K/Akt (Venema, 2002; Fleming and Busse, 2003), modulando así sus efectos proangiogénicos.

### **2.1.1.2 Factores antiangiogénicos: las vasoinhibinas**

Las Vi son una familia de péptidos que se generan por corte proteolítico de la hormona prolactina, de la hormona de crecimiento y del lactógeno placentario (Clapp *et al.*, 2006; Clapp *et al.*, 2008). La catepsina D (Baldocchi *et al.*, 1993; Piwnica *et al.*, 2004), las metaloproteasas de matriz (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 y MMP-13) (Macotella *et al.*, 2006), y la metaloproteasa morfogénica de hueso 1 (Ge *et al.*, 2007) generan Vi a partir de la prolactina. Dado que sólo un estudio ha reportado las acciones de las Vi derivadas de la hormona de crecimiento (Struman *et al.*, 1999), la información sobre dichos péptidos proviene en su mayoría de las Vi derivadas de la prolactina. Las Vi ejercen sus efectos antiangiogénicos a través de un sitio de unión de alta afinidad presente en células endoteliales, el cual es distinto al receptor de prolactina (Clapp and Weiner, 1992). Se han identificado en el plasma sanguíneo, en células endoteliales, en líquido amniótico, en la glándula pituitaria anterior y en el ojo (Corbacho *et al.*, 2000). Su efecto antiangiogénico se ha demostrado en distintos modelos animales, como la córnea de conejo y la membrana corioalantoidea de embrión de pollo, donde disminuyen el crecimiento de vasos sanguíneos (Clapp *et al.*, 1993; Struman *et al.*, 1999). De manera importante, la

inyección intravítreal de anticuerpos anti-Vi y de un micro RNA de interferencia contra la prolactina, genera angiogénesis en la retina y vasodilatación (Aranda *et al.*, 2005; Clapp *et al.*, 2009), demostrando con ello que las Vi participan en la inhibición endógena de la angiogénesis ocular.

Uno de sus principales efectos es la disminución de la vasopermeabilidad inducida por el VEGF, mediante un mecanismo que involucra promover la desfosforilación de la eNOS y bloquear la producción de NO (Garcia *et al.*, 2008). Al bloquear la producción de NO también se previene la activación de la vía de las MAP cinasas inhibiendo la proliferación endotelial inducida por VEGF (D'Angelo *et al.*, 1995; D'Angelo *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2008). Las Vi también modulan sus efectos sobre la proliferación endotelial de manera independiente a la activación por VEGF, bloqueando las transiciones G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>-M del ciclo celular al interferir con las ciclinas D<sub>1</sub> y B<sub>1</sub> y al sobreactivar a los inhibidores p21 cip1 y p27 Kip1 (Tabruyn *et al.*, 2005). Se sabe que las Vi estimulan la apoptosis de las células endoteliales al promover la conversión de Bcl-X<sub>L</sub> a su forma proapoptótica Bcl-X<sub>S</sub> (Martini *et al.*, 2000) y al activar el factor nuclear Kappa β resultando en la activación de las caspasas 8, 9 y 13 (Tabruyn *et al.*, 2003). Las Vi inhiben al activador de plasminógeno de tipo urocinasa, proteasa requerida para la migración de células endoteliales (Han *et al.*, 2002). Con respecto a los efectos de las Vi sobre los efectos endoteliales de la BK, en el 2004 Gonzalez y colaboradores demostraron que las Vi bloquean la movilización de calcio y la producción de NO inducida por la BK, lo cual resulta en un efecto vasoconstrictor (Gonzalez *et al.*, 2004). Finalmente estudios preliminares del laboratorio sugieren que las Vi inhiben la proliferación de células endoteliales inducida por BK; sin embargo, aún queda por confirmar dicho efecto y dilucidar si involucra a la regulación de la producción de NO.

En resumen, varios eventos fisiológicos dependen del delicado equilibrio entre los factores pro- y antiangiogénicos. Sin embargo, ¿qué ocurre cuando se desregula el balance entre factores pro- y antiangiogénicos?

### **2.1.2 Consecuencia del desbalance entre factores pro- y antiangiogénicos: enfermedades angiogénesis-dependientes**

El desbalance entre factores pro- y antiangiogénicos precede y/o contribuye a la progresión de diversas patologías. Las enfermedades angiogénesis-dependientes pueden relacionarse con una falta o un exceso de angiogénesis. Por ejemplo, en la preeclampsia existe un incremento en la expresión de factores antiangiogénicos por la placenta, como el receptor soluble VEGFR-1, lo que genera disfunción del endotelio que deriva en hipertensión, entre otros síntomas (Clapp *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2010). Otra patología donde existe un incremento de factores antiangiogénicos es la cardiopatía de postparto, donde el estado de estrés oxidativo, genera un incremento en los sistemas de corte de la prolactina incrementando la producción de Vi, las cuales contribuyen a las alteraciones cardiacas (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007). Por otra parte, un estado de hipoxia crónica debido a deficiencias en el riego sanguíneo, o al incremento de la demanda de oxígeno, genera una expresión exacerbada de factores proangiogénicos (Chen *et al.*, 2009). Tal es el caso del cáncer, donde existe un incremento de la expresión de VEGF, PDGF, bFGF, entre otros (Folkman, 2006). En la artritis reumatoide participan el VEGF, el bFGF, el TNF- $\alpha$ , entre otros (Szekanecz and Koch, 2008), y en las retinopatías vasoproliferativas el VEGF, el IGF-1, el PDGF, y la BK, entre otros (Aiello *et al.*, 1994; Pombo *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2007). Existen diversas retinopatías vasoproliferativas de las cuales podemos mencionar a la del prematuro, la degeneración macular asociada con la edad, y la retinopatía diabética (Campochiaro, 2000; Carmeliet, 2005).

Las retinopatías vasoproliferativas como la del prematuro y la diabética tienen un impacto social y económico considerable dado que la retinopatía del prematuro es la principal causa de ceguera infantil en países en vías de desarrollo (Reynolds, 2001) y la retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en adultos laboralmente activos (Gariano and Gardner, 2005; Mohamed *et al.*, 2007). Tanto el VEGF, la BK, como las Vi se han asociado con la retinopatía diabética.

### **2.1.2.1 Implicación del VEGF y de la BK en la retinopatía diabética**

La desregulación metabólica en pacientes diabéticos genera daños a la microvasculatura de la retina: la hiperglicemia crónica induce apoptosis en los pericitos y en las células endoteliales (Gerald *et al.*, 2009), lo cual genera un incremento de la vasopermeabilidad, aparición de hemorragias, edema y formación de exudados (Crawford *et al.*, 2009). Todo esto contribuye a la oclusión de los vasos sanguíneos, generando zonas de isquemia e hipoxia, condición que promueve la expresión de factores proangiogénicos (Duenas *et al.*, 2004; Dhanabal and Sethuraman, 2006; Wang *et al.*, 2009). El incremento en los niveles de los factores proangiogénicos en el vítreo promueve el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, los cuales son frágiles y generan hemorragias dentro del vítreo que pueden derivar en la pérdida de la visión (Hammes, 2005; Crawford *et al.*, 2009). Estudios en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética demuestran un incremento en los niveles de VEGF de más del 80% comparado con pacientes diabéticos que no presentan retinopatía (Aiello *et al.*, 1994). Este mitógeno se ha considerado como el principal factor involucrado en la progresión de la retinopatía diabética y de otras retinopatías como la degeneración macular asociada a la edad. Es por ello que la inyección intravítreal de anticuerpos monoclonales anti-VEGF, se ha utilizado como terapia alternativa en la degeneración macular asociada a la edad (Emerson and Lauer, 2007). Sin embargo, esta terapia además de ser costosa, se acompaña de una serie de complicaciones importantes, como el riesgo de inflamación ocular y glaucoma cuando se combina con anti-inflamatorios (Simo *et al.*, 2002).

Se ha descrito la importante participación de otros factores proangiogénicos en la retinopatía diabética, por ejemplo el IGF-1 y el bFGF cuyos niveles en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética se encuentran elevados; así mismo, la Ang-2 y la interleucina 8 contribuyen en la patología (Poulaki *et al.*, 2004; Clapp *et al.*, 2009). Recientemente se ha demostrado la importancia de la BK en el curso de la retinopatía diabética (Das and McGuire, 2003). En el 2007, Gao y colaboradores encontraron en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética, un incremento en los niveles de la enzima anhidrasa carbónica; esta enzima produce  $\text{HCO}_3^-$  promoviendo el incremento del pH en el vítreo. El incremento en el pH activa al sistema calicreína-cininas produciendo BK, la cual incrementa la vasopermeabilidad retiniana. Asimismo, la inyección de anhidrasa carbónica

en el vítreo de ratas genera incremento en la vasopermeabilidad, lo cual se revierte utilizando antagonistas del receptor B1 y B2 de la BK (Gao *et al.*, 2007). También Abdouh y colaboradores en el 2008, revierten el incremento en la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas utilizando un antagonista para el receptor B1 de la BK (Abdouh *et al.*, 2008).

### **2.1.2.2 Papel de las vasoinhibinas en la retinopatía diabética: relevancia terapéutica**

Recientemente se demostró que las Vi previenen el incremento de la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas y en respuesta a la inyección intravítreal de VEGF y de vítreo de pacientes con retinopatía diabética (Garcia *et al.*, 2008). Por otra parte, se sabe que existe un incremento en los niveles circulantes del precursor de las Vi, la prolactina, en pacientes diabéticos (Clapp *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando estos pacientes no tienen un control adecuado en sus niveles de glucosa o cuando cursan con retinopatía diabética, los niveles circulantes de prolactina disminuyen (Clapp *et al.*, 2009; Triebel *et al.*, 2009), lo que puede contribuir a una disminución de los niveles oculares de Vi y por lo tanto al desarrollo y progresión de la enfermedad. Sin embargo, el uso potencial de las Vi en el tratamiento contra la retinopatía diabética requiere todavía más conocimiento acerca de sus mecanismos de acción en la retina, en particular sobre la vía de la BK.

Con el fin de analizar los mecanismos por los cuales las Vi regulan a la vía de la BK, en este trabajo postulamos que la regulación de la producción del NO podría ser el denominador común entre la BK y las Vi.

## **2.2. El NO: actor central en la regulación de la angiogénesis**

### **2.2.1 Generalidades**

En 1980 se detectó en el endotelio, una sustancia capaz de generar relajación vascular, a esta sustancia se le denominó factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980), y posteriormente se identificó como el NO (Ignarro *et al.*, 1988). Hoy se sabe que el NO, no sólo modula la relajación vascular sino también una gran cantidad de efectos biológicos distintos e inclusive opuestos (Thomas *et al.*, 2008). Dentro de estos podemos mencionar la vasodilatación, el incremento de la vasopermeabilidad, la

inducción de la proliferación celular pero también de la apoptosis, efectos como neurotransmisor, propiedades bactericidas, entre otros (Schmetterer and Polak, 2001). Los efectos del NO dependen de su sitio de síntesis, pero sobre todo de su concentración. El NO es sintetizado por la enzima sintetasa de NO (NOS), la cual existe en tres isoformas: dos constitutivas, la isoforma neural (nNOS) y la isoforma endotelial (eNOS), y una isoforma inducible (iNOS) (Schmetterer and Polak, 2001).

EL NO producido en el endotelio es un potente agente proangiogénico a concentraciones inferiores a 400 nM, pero resulta ser antiangiogénico a concentraciones mayores (Thomas *et al.*, 2008). Su efecto proangiogénico es principalmente a través de incrementar la vasopermeabilidad; así mismo, el NO es considerado como uno de los principales reguladores de la migración endotelial (Lamallice *et al.*, 2007), a través de inducir la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK), la cual participa en la reorganización del citoesqueleto, la adhesión, el crecimiento y la sobrevivencia de células endoteliales (Lee *et al.*, 2010). El NO participa también de manera importante en la proliferación y la sobrevivencia endotelial, ya que promueve la síntesis de cGMP, activando a la proteína cinasa dependiente de cGMP (PKG), la cual fosforila a la proteína Raf, que finalmente activa a la vía de las MAP cinasas (Dimmeler *et al.*, 1997; Murohara *et al.*, 1998; Murohara *et al.*, 1999; Urbich *et al.*, 2002).

En resumen se puede considerar al NO como una llave de encendido/apagado de la angiogénesis. Como se ha mencionado, el que sea una señal pro- o antiangiogénica depende de donde se produce y de sus niveles. Por enfocarnos en la función endotelial se presentarán a continuación los diferentes niveles de regulación de la eNOS.

### **2.2.2 Regulación de la activación de la sintetasa endotelial de NO**

La eNOS es una enzima de 135 kDa aproximadamente que se expresa constitutivamente en células endoteliales. Estructuralmente presenta dos dominios, en el extremo N-terminal posee un dominio oxigenasa mientras que en el extremo C-terminal un dominio reductasa (Alderton *et al.*, 2001). La eNOS cataliza la reacción de oxidación de la L-arginina a L-citrulina y NO. Dicha reacción requiere de la presencia de distintos cofactores como el mononucleótido de flavina (FMD), la nicotina adenina dinucleótido (NADH), la tetrahidrobiopterina (BH4), y de manera muy importante la unión del complejo

calcio-calmodulina (Thorin *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2006). Dicho complejo promueve el flujo de electrones necesarios para catalizar la oxidación de la L-arginina. Sustancias proangiogénicas y vasoactivas como el VEGF y la BK, al unirse a sus receptores, incrementan la concentración de calcio intracelular, el cual por unirse a la calmodulina activa a la eNOS. El incremento de la concentración de calcio citosólico puede resultar de un influjo de calcio de origen extracelular por canales membranales de tipo “Receptor Operated Channels” (ROC) o de la liberación del calcio almacenado en el retículo endoplásmico (por receptores a IP3 o a rianodina) (Mikoshiha, 2007). El vaciamiento del retículo endoplásmico estimula canales membranales de tipo “Store Operated Channels” (SOC) con el fin de restaurar las reservas de calcio intracelular (Parekh and Putney, 2005). Tanto el calcio de origen extracelular (por los ROC o SOC), como el calcio liberado del retículo endoplásmico se pueden unir a la calmodulina. Se sabe que el VEGF y la BK, al activar las PLC  $\gamma$  y  $\beta$  respectivamente (Zachary and Glick, 2001; Liesmaa *et al.*, 2009), incrementan los niveles de calcio intracelular al liberar el calcio reticular (vía del IP3) o por un flujo de origen extracelular (vía del DAG) (Cheng *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2006).

Por otra parte, además de la presencia necesaria de los cofactores mencionados, la eNOS se ve regulada a nivel de su expresión y/o de su actividad. Se sabe que el promotor del gen que codifica la eNOS posee numerosos sitios de unión de factores de transcripción, como el activador de proteína 1/2, el factor nuclear (NF)-1, NF-IL6, NF- $\kappa$ B, p53, y el elemento responsivo a cAMP, entre otros (Fleming and Busse, 2003). La expresión de la eNOS también se regula mediante la estabilización de su mRNA, por su unión a través de la región 3' no traducible del mRNA, a la región rica en cisteínas de dos proteínas citosólicas (51 y 60 kDa) (Fleming and Busse, 2003). Durante la fase de replicación, la expresión del mRNA de eNOS se incrementa de 4 a 6 veces en comparación con una fase quiescente *in vitro*.

Finalmente, diversas hormonas, factores de crecimiento, y citocinas, como los estrógenos, el VEGF, entre otros, pueden regular la expresión del mRNA de la eNOS (Arnal *et al.*, 1994; Searles *et al.*, 1999). Otro mecanismo importante de regulación, es a través de eventos de fosforilación/desfosforilación. La eNOS puede ser fosforilada de manera simultánea o alternada en residuos de serina, treonina y tirosina (Musicki *et al.*, 2009). Debido a la secuencia de aminoácidos de la enzima, las posibilidades son

considerables, sin embargo, los efectos de la fosforilación en el residuo de serina 1177, para la secuencia humana y serina 1179 para la secuencia bovina (Fleming and Busse, 2003), son considerados como los más relevantes por incrementar la actividad de la enzima: en condiciones basales este residuo de serina se mantiene desfosforilado; tras un estímulo se fosforila rápidamente incrementando la actividad de la enzima de dos a tres veces sobre la actividad basal. En presencia de VEGF, la cinasa encargada de fosforilar a la eNOS es la Akt, cuando el estímulo es a través de los receptores de la BK, es a través de la CaMKII (Fleming and Busse, 2003). No obstante, existen estudios que sugieren la participación de la vía de PI3K/Akt en la fosforilación de eNOS inducida por la BK (Venema, 2002).

En cuanto a las Vi y la eNOS, se sabe que tienen efectos tanto en la movilización de calcio intracelular como sobre la fosforilación. Recientemente se demostró en cultivos celulares, que la fosforilación de la eNOS en el residuo de Ser 1179 inducida con VEGF, es revertida por las Vi. La desfosforilación de la eNOS es regulada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Garcia *et al.*, 2008); utilizando un inhibidor de esta fosfatasa (ácido ocadaico) se encontró que el efecto de las Vi sobre la fosforilación de la eNOS es a través de la PP2A (Garcia *et al.*, 2008). También se ha demostrado que las Vi bloquean la movilización de calcio y la activación de la eNOS inducida por BK *in vitro*, siendo este uno de los posibles mecanismos por los que las Vi disminuyen la vasodilatación inducida por la BK en la arteria coronaria de cobayo (Gonzalez *et al.*, 2004).

### **3. Planteamiento del problema**

En este trabajo pretendemos dilucidar las bases moleculares del efecto inhibitorio de las Vi sobre la proliferación endotelial inducida por la BK *in vitro*, las cuales podrían involucrar a la producción de NO por la eNOS, esta misma siendo regulada por el calcio intracelular mediante la fosfolipasa C y/o por su estado de fosforilación.

### **4. Hipótesis**

El efecto inhibitorio de las Vi sobre la proliferación endotelial inducida por BK se lleva a cabo a través del bloqueo de la activación de eNOS, por disminución de la actividad de la fosfolipasa C y/o por su desfosforilación en el residuo Ser 1179.

### **5. Objetivo**

Caracterizar las vías de señalización intracelulares por las cuales las Vi inhiben la acción estimuladora de la BK sobre la proliferación endotelial *in vitro*.

#### **5.1 Objetivos específicos**

1. Analizar el efecto inhibitorio de las Vi sobre la proliferación de células endoteliales estimulada con la BK y determinar si este efecto involucra la producción de NO.
2. Investigar si las Vi afectan la vía clásica de señalización de la BK al nivel de la actividad de la fosfolipasa C en cultivos de células endoteliales.
3. Analizar el efecto de las Vi sobre la fosforilación de la eNOS inducida por la BK en células endoteliales.
4. Determinar el efecto de las Vi sobre la producción de NO inducida por BK en células endoteliales en cultivo.

## 6. Materiales y métodos

**6.1 Cultivos celulares** – Se utilizan cultivos primarios de células endoteliales de la vena umbilical de bovino (BUVEC) las cuales se cultivan en un medio F12-HAM con 10% de suero fetal bovino, 1/100 penicilina/estreptomocina y se mantienen a una temperatura 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

**6.2 Ensayo de proliferación** – La tasa de proliferación de las células endoteliales se determina mediante la incorporación de timidina tritiada (Amersham Internacional plc, Little Chalfont Buckinghamshire, Inglaterra). En cajas de 48 pozos se siembran 5,000 células/pozo en 200 µl de medio de bioensayo (F12-HAM 10% suero de bovino fetal + antibióticos) y se cultivan durante 48 h en presencia o ausencia de distintas concentraciones de BK (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) y/o Vi recombinantes con o sin adición de un donador de NO, (Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonio-ethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate o DET-ANONOato, 10 µM (Alexis Biochemicals, San Diego, CA). 24 h antes que se cumplan las 48 h de incubación se adiciona 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina, la cual es una base nitrogenada que se incorpora al DNA de las células en proliferación. Cumplidas las 48 h de incubación, se realizan tres lavados con 200 µl de TCA al 5% y en el último lavado se incubaba a 4°C durante al menos 20 minutos. Posteriormente se adiciona 250 µl de NaOH a ebullición y por último se transfiere el NaOH a tubos con 5 ml de líquido de centelleo donde se cuantifica la incorporación de la [<sup>3</sup>H]-timidina.

**6.3 Evaluación de la actividad de la fosfolipasa C in vitro** – Para evaluar el efecto de las Vi sobre la vía de la fosfolipasa C activada por la BK, las BUVEC se incuban a 37°C durante 5 minutos con Vi, seguido o no de BK por 2 minutos. Posteriormente la actividad de la fosfolipasa C y la producción de IP<sub>3</sub> se evalúan usando los estuches comerciales siguientes: PIP<sub>2</sub> [myo-inositol-2-<sup>3</sup>H (N)] (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO) y el D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate (Biotrak Assay System, Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, Inglaterra).

**6.4 Evaluación de la expresión y fosforilación de eNOS** – La expresión de eNOS se evalúa en cultivos de células BUVEC tratadas por 1, 5 y 10 min con BK combinada o no con Vi, en comparación con el medio de cultivo (condición control). Para ello se aíslan las proteínas de los lisados de células, utilizando como amortiguador de extracción 0.5% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 µg/ml aprotinina, y 0.5 mM PMSF. Se analiza la expresión de eNOS por Western-blot usando anticuerpos anti-fosfo-eNOS-Ser<sup>1179</sup> y anti-eNOS total. Las proteínas se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida (15%) con dodecilsulfato de sodio (SDS). Las proteínas separadas por electroforesis son transferidas a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incuban con los anticuerpos policlonales anti-fosfo-eNOS-Ser<sup>1179</sup> y anti-eNOS total. El complejo antígeno-anticuerpo se revela con la reacción de fosfatasa alcalina y el empleo de un estuche comercial de anticuerpos secundarios (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

**6.5 Evaluación de NO in vitro** – El efecto de las Vi sobre la producción de NO inducida por BK en células BUVEC, se evalúa mediante el método de la citrulina radiactiva el cual mide la actividad de la eNOS. Para esto se cultivan 50,000 células por pozo en placas de 12 pozos, se adiciona 10 µl de aprotinina, 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-L-arginina, y los tratamientos; la [<sup>3</sup>H]-L-arginina sirve de sustrato para la eNOS que lleva a cabo una reacción que da como producto [<sup>3</sup>H]-L-citrulina y NO equimolarmente. Cumplida 1 h se para la reacción con medio de paro (50 mM HEPES, 4 mM EDTA a pH 5.5), por diez minutos; pasado este tiempo se adiciona HEPES a 4°C para lisar las células, y por último se pasa esta solución por columnas de intercambio iónico y se cuantifica la [<sup>3</sup>H]-L-citrulina por conteo en líquido de centelleo.

**6.6 Análisis estadístico**- Los datos se presentarán como promedios ± error estándar de la media. La significancia estadística se determinará por el análisis de varianza (ANOVA) seguida como prueba post-hoc de la prueba de T de Student no pareada. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa Sigma Stat 7.0 (Sigma Stat 7.0, Systat Software Inc., San Jose, CA). Diferencias en el promedio con una P<0.05 son consideradas estadísticamente significativas.

## 7. Resultados

### 7.1 Las Vi inhiben la proliferación de células endoteliales BUVEC estimulada con BK de manera dosis-dependiente

La administración de la BK en cultivos de células endoteliales BUVEC induce un incremento en la proliferación celular de manera dosis-dependiente; las concentraciones evaluadas fueron: 0.5, 1, 5, 10, y 20  $\mu\text{M}$ . La concentración de 5  $\mu\text{M}$  provocó el mayor porcentaje de proliferación comparada contra el control, efecto que disminuye al incrementar la concentración (Figura 2).

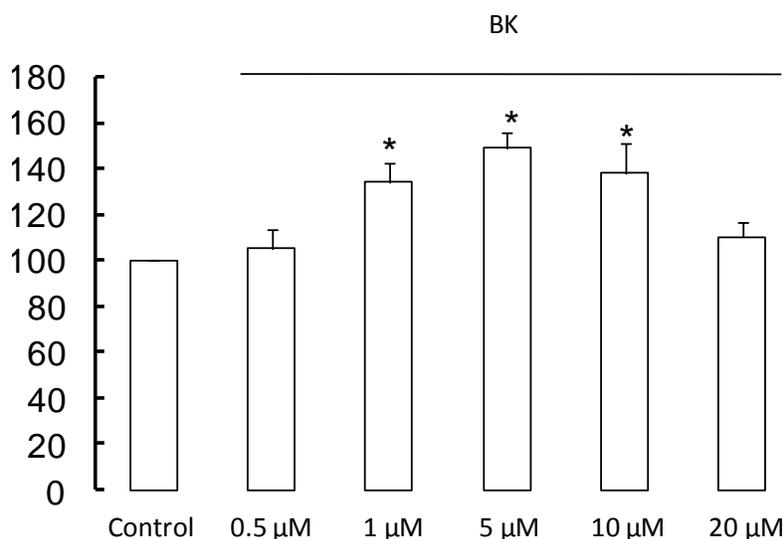


Figura 2. Efecto de la BK sobre la proliferación de células BUVEC.  $n = 7$ ,  $*P < 0.001$  vs. Control.

Con base en el resultado anterior se decidió utilizar la concentración de 5  $\mu\text{M}$  para estudiar el efecto de las Vi sobre la proliferación celular inducida por la BK (Figura 3). Células BUVEC fueron estimuladas con la BK y con distintas concentraciones de Vi (10, 20, 40, 60 y 80 nM). Las concentraciones de 60 y 80 nM de Vi disminuyeron la proliferación de células BUVEC inducida por BK.

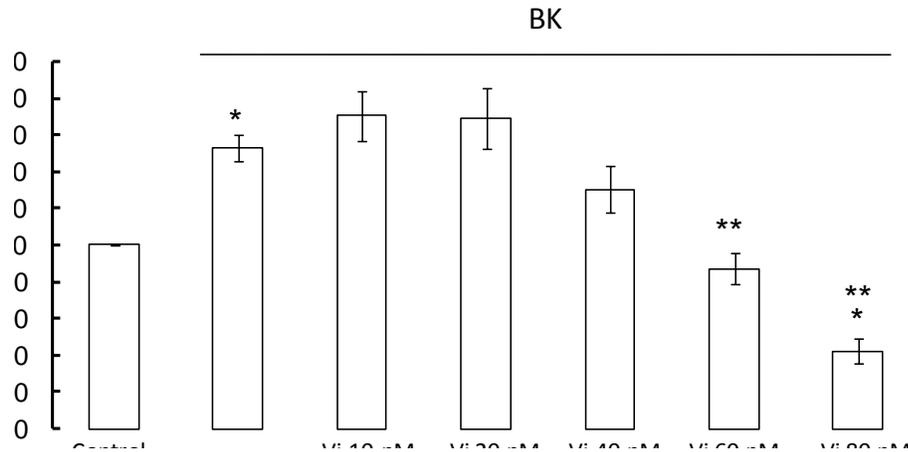


Figura 3. Efecto de las Vi sobre la proliferación de células BUVEC inducida por BK (5  $\mu$ M). n = 8, \* P< 0.05 vs. Control; \*\* P<0.05 vs. BK.

## 7.2 El efecto de las Vi sobre la proliferación celular inducida por BK involucra la producción de NO

Adicionalmente, exploramos si el efecto de las Vi sobre la proliferación endotelial inducida por la BK es a través de la regulación de la producción de NO. Para ello probamos el efecto del donador de NO, DET-ANONOato (10  $\mu$ M), sobre células BUVEC tratadas con BK (5  $\mu$ M) y Vi (40 nM) (Figura 4). El DET-ANONOato estimula la proliferación de células BUVEC de manera comparable a la BK, pero no potencia el efecto de la BK, lo que sugiere que comparten mecanismos por los cuales inducen la proliferación celular. Las Vi no tiene ningún efecto sobre la proliferación celular inducida por el DET-ANONOato, pero sí sobre la proliferación celular inducida por BK. Sin embargo, este efecto de las Vi es revertido en presencia del donador de NO (Figura 4). Esto sugiere que el efecto inhibitorio de las Vi sobre proliferación endotelial inducida por BK puede ser a través de la regulación de la producción de NO.

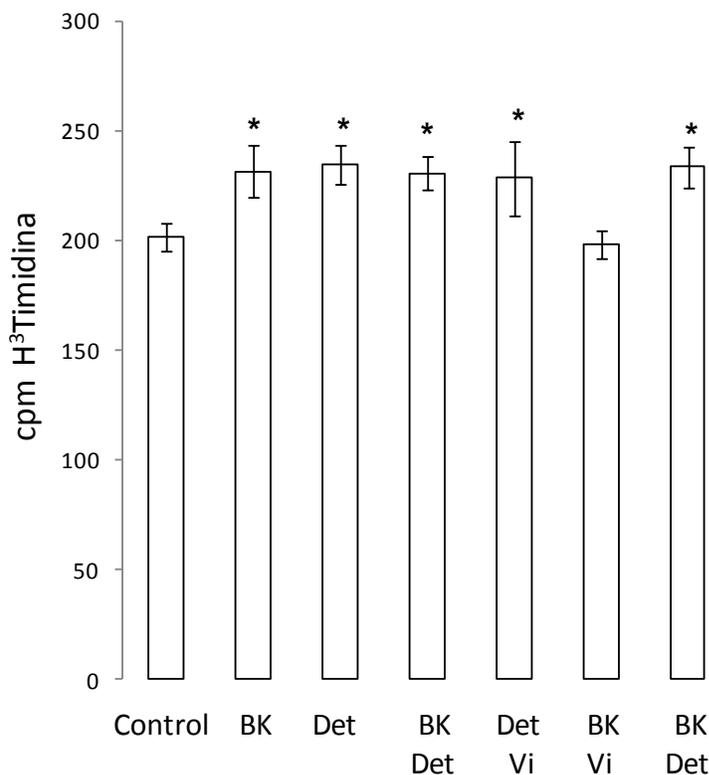


Figura 4. Análisis del efecto de un donador de NO, el DET-ANONOato (10  $\mu$ M), sobre la proliferación de células BUVEC tratadas con BK (5  $\mu$ M) y Vi (40 nM). n = 4, \*P<0.05 vs. Control.

### 7.3 Las Vi bloquean la vía clásica de señalización de la BK a nivel de la actividad de la fosfolipasa C beta y de la producción de IP<sub>3</sub> en las células endoteliales BUVEC

La BK al unirse con su receptor, activa a la PLC- $\beta$ , la cual produce IP<sub>3</sub> y DAG (Myers and Larkins, 1989). Para corroborar si las Vi interfieren con la vía de la PLC activada por la BK, medimos su actividad (Figura 5) y la producción de IP<sub>3</sub> (Figura 6). Para ello se adicionó fosfatidilinositol radiomarcado (PIP<sub>2</sub> [myo-inositol-2-3H (N)]) por 48 h, el cual se incorporó a las células BUVEC como sustrato para la PLC. Las células fueron incubadas con BK por 2 min en presencia o ausencia de Vi durante 5 min. La adición de las Vi se realizó de dos maneras: antes del estímulo con BK y después de la BK. Posteriormente se cuantificaron los fosfatos de inositol radiomarcados [<sup>3</sup>H], productos de la degradación del PIP<sub>2</sub> radiomarcado (Sorrentino *et al.*, 1996). De esta manera encontramos

que la BK incrementa 2.6 veces la actividad de la fosfolipasa C en comparación con el control, efecto que es bloqueado por las Vi cuando se aplican antes de la BK. Sin embargo, si las Vi se adicionan después de la BK, la activación de la PLC se mantiene (Figura 5). Esto indica que las Vi actúan cascada arriba de la activación de la PLC.

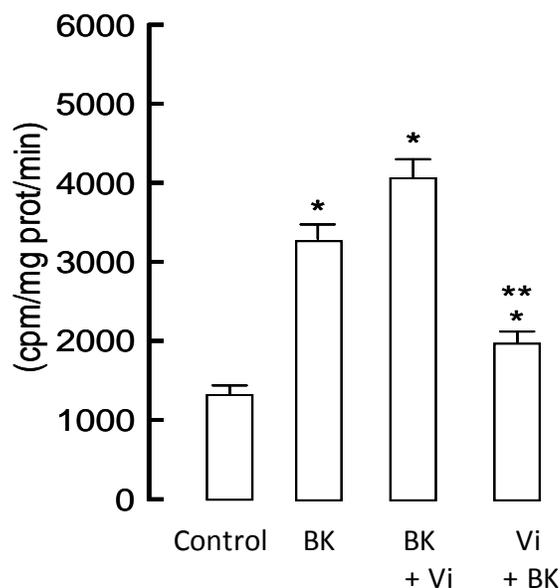


Figura 5. Análisis del efecto de las Vi (40 nM) sobre la actividad de la PLC inducida por BK (5  $\mu$ M) en células BUVEC. n = 3, \*P<0.001 vs. Control; \*\*P<0.001 vs. BK.

Asimismo, se evaluó la producción de IP<sub>3</sub> en células tratadas con BK y Vi. El ensayo requiere de una cantidad fija de IP<sub>3</sub> radioactivo (D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate) que se adiciona a las células endoteliales; este IP<sub>3</sub> se une a sus receptores en el retículo endoplásmico y el IP<sub>3</sub> endógeno producido por la activación de la PLC desplaza al IP<sub>3</sub> radioactivo unido previamente. Por lo tanto, la señal obtenida en el contador de centelleo es inversamente proporcional al IP<sub>3</sub> producido. De esta manera, encontramos que la BK promueve la producción de IP<sub>3</sub> en comparación con el control, lo cual no se ve afectado por las Vi administradas 5 minutos después de la BK (Figura 6). La administración de Vi no tiene efecto en la producción de IP<sub>3</sub>, sin embargo, la incubación de las células BUVEC con las Vi 5 minutos previos al tratamiento con BK previene el incremento de la producción de IP<sub>3</sub> (Figura 6).

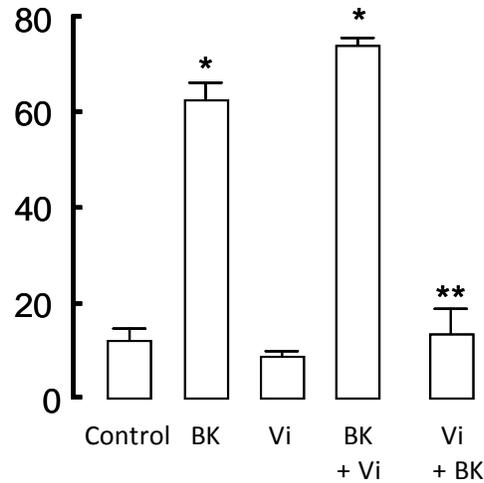


Figura 6. Análisis del efecto de las Vi (40 nM) sobre la producción de IP<sub>3</sub> inducida por BK (5 μM) en células BUVEC. n = 3, \*P<0.001 vs. Control; \*\*P<0.001 vs. BK.

#### 7.4 Efecto de las Vi sobre la fosforilación de eNOS inducida por BK en células endoteliales BUVEC

Previamente demostramos que la proliferación endotelial inducida por la BK implica al NO (Figura 4). En un esquema general, la BK induce la producción de NO al incrementar la concentración de calcio citosólico el cual es captado por la calmodulina; este complejo se une a la eNOS promoviendo su activación. Asimismo, el complejo calcio-clamodulina promueve la activación de la CaMKII, cinasa que fosforila a la eNOS; esta fosforilación también puede ser por la vía PI3K/Akt (Venema, 2002; Fleming and Busse, 2003). Estudios previos demuestran que las Vi inhiben la activación de la eNOS inducida por el VEGF al revertir su fosforilación mediante la fosfatasa PP2A (Gonzalez *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2008). Debido a ello quisimos determinar si las Vi pudieran actuar de manera semejante sobre la fosforilación de eNOS inducida por BK. Para este fin evaluamos la fosforilación de eNOS en células endoteliales BUVEC incubadas con BK y Vi a distintos tiempos, utilizando la técnica de Western-blot con anticuerpos anti-serina fosforilada y anti-eNOS total (Figura 7). Encontramos que las Vi disminuyen la fosforilación de la eNOS inducida por BK en los distintos tiempos analizados.

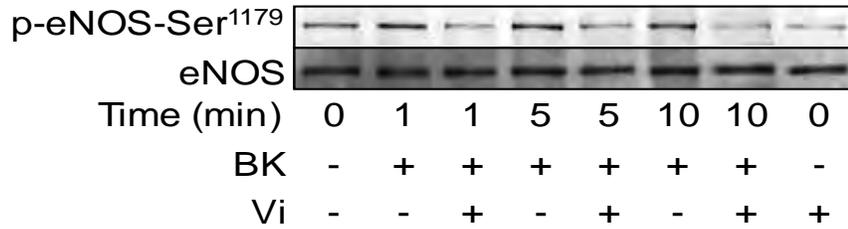


Figura 7. Análisis del efecto de las Vi (40 nM) sobre la fosforilación de eNOS inducida por BK (5  $\mu$ M, 1, 5 y 10 minutos) en células BUVEC.

Por último, cuantificamos la producción de NO en células BUVEC tratadas con BK y Vi, mediante la técnica de la citrulina radiactiva (Figura 8). En esta técnica se cuantifica la cantidad de L-citrulina producida proveniente de L-arginina marcada radiactivamente, lo que nos indica indirectamente la cantidad de NO producido. Las Vi por sí mismas, es decir, en ausencia de estímulo, no tienen efecto sobre la producción de NO. Las Vi inhiben la producción de NO inducida por BK a niveles comparables con el control.

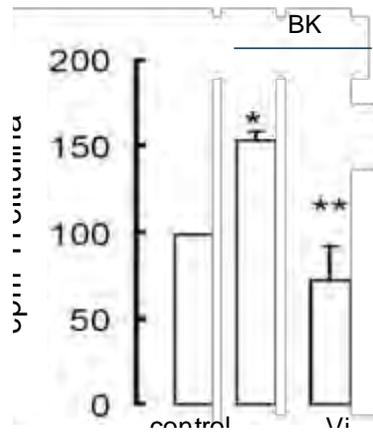


Figura 8. Análisis del efecto de las Vi (40 nM) sobre la producción de NO inducida por la BK (5  $\mu$ M) en células BUVEC. n = 3, \*P<0.001 vs. Control; \*\*P<0.001 vs. BK.

## 8. Discusión

La retinopatía diabética es de las complicaciones a largo plazo más comunes de la diabetes mellitus, enfermedad que afecta a más de 20 millones de personas en el mundo. La retinopatía diabética actualmente es la principal causa de ceguera en adultos entre 20 y 74 años, cada año genera entre 12000 y 24000 casos de ceguera (Carmeliet, 2005). Las estrategias para prevenir la retinopatía diabética se basan en el control de los niveles circulantes de glucosa, la exploración anual oftalmológica completa (con dilatación pupilar y fluoroangiografía) (Wirostko *et al.*, 2008). Actualmente la fotocoagulación con láser y la vitrectomía son los únicos tratamientos aprobados para la retinopatía diabética; estas terapias con un enfoque destructivo, son parcialmente efectivas ya que en muchos casos (más del 25%), la enfermedad progresa a pesar de la terapia, y por sí mismas puede generar pérdida de la agudeza y del campo visual (Bloomgarden, 2007; Gardner and Antonetti, 2007). Recientemente, se ha empleado la inyección intravítreal de anticuerpos monoclonales anti-VEGF para el tratamiento de las retinopatías vasoproliferativas, en particular la degeneración macular asociada a la edad. Sin embargo, esta terapia además de ser costosa, se acompaña de una serie de complicaciones (Simo *et al.*, 2002; Wirostko *et al.*, 2008). Por lo tanto, sería deseable contar con estrategias terapéuticas adicionales y/o combinatorias. En este sentido, el uso de factores capaces de inhibir la angiogénesis ocular, entre ellos las Vi, se presenta como una opción promisoriosa para el tratamiento de las retinopatías vasoproliferativas.

La hiperglucemia crónica en pacientes diabéticos promueve alteraciones en la microvasculatura ocular como la apoptosis de los pericitos y células endoteliales, engrosamiento de la membrana basal e incremento en la vasopermeabilidad (Knudsen *et al.*, 2002; Hammes, 2005; Crawford *et al.*, 2009). Estos eventos promueven la aparición de zonas hemorrágicas y formación de exudados en que ocluyen a los capilares, generando hipoxia y disparando la expresión de factores proangiogénicos (Knudsen *et al.*, 2002; Hammes, 2005). El VEGF es uno de los principales factores proangiogénicos en la retinopatía diabética, pero existen otros factores que participan en el desarrollo de la enfermedad, entre ellos la BK (Gao *et al.*, 2007). Estudios recientes (Gao *et al.*, 2007; Abdouh *et al.*, 2008), demuestra la importancia de la BK en la retinopatía diabética y su

posible implicación como blanco terapéutico. La BK es bien conocida por su efecto vasodilatador, y también se sabe que induce proliferación de células endoteliales y formación de túbulos endoteliales, lo cual contribuye a sus efectos proangiogénicos (Morbidelli *et al.*, 1998; Clapp *et al.*, 2009; Phipps *et al.*, 2009). El incremento en la proliferación endotelial es un paso determinante para la formación de nuevos vasos sanguíneos, por otra parte muchos factores antiangiogénicos modulan sus efectos mediante el bloqueo de la proliferación endotelial (Nyberg *et al.*, 2005). Es por esto que decidimos evaluar el efecto de las Vi sobre la proliferación endotelial inducida por la BK, encontrando que la proliferación de células BUVEC inducida por la BK es bloqueada por las Vi de manera dosis-dependiente (Figura 3).

El NO juega un papel fundamental en el proceso angiogénico, ya que modula distintos procesos celulares necesarios para la formación de los vasos sanguíneos, como son el incremento en la vasopermeabilidad, migración y proliferación endotelial (Feil *et al.*, 2005). Para averiguar si el efecto de las Vi sobre la proliferación endotelial inducida por BK implicaba la regulación del NO, se utilizó un donador de NO (DET-ANONOatos). Al adicionar NO exógeno a las células BUVEC, se observó un incremento en la proliferación celular de manera comparable a la inducida por la BK; sin embargo, este efecto no se potencia cuando se combina la BK y el donador de NO. Esto indica que la BK induce proliferación celular mediante la producción de NO. Por otra parte, cuando se adiciona el donador de NO en presencia de la BK y las Vi, se mantiene la proliferación celular (Figura 4). Con esto se concluye que las Vi modulan su efecto sobre la proliferación celular inducida por la BK, mediante la inhibición de la producción de NO.

La BK incrementa la síntesis de NO al activar a la eNOS por dos mecanismos: un incremento de la concentración intracelular de calcio y la fosforilación de la serina 1177. El incremento en la concentración intracelular de calcio se dispara por la activación de la enzima PLC- $\beta$  la cual produce IP<sub>3</sub> y DAG, y ambos metabolitos contribuyen a este efecto. El IP<sub>3</sub> se une rápidamente a su receptor en el retículo endoplásmico (IP<sub>3</sub>-R), y libera el calcio ahí almacenado al espacio citosólico. En este trabajo demostramos, que las Vi previenen la activación de la PLC y por ende la producción de IP<sub>3</sub> (Figuras 5 y 6); esto prevendría el incremento de calcio proveniente del retículo endoplásmico, lo cual ha sido reportado por nuestro laboratorio anteriormente (Gonzalez *et al.*, 2004).

Cabe señalar que el DAG generado por la PLC regula de manera importante el influjo de calcio de origen extracelular, a través de canales membranales como los TRPs, entre otros. Los canales TRP, en particular la subfamilia C activada por DAG, han surgido como importantes moduladores de la angiogénesis (Nilius and Droogmans, 2001; Yao and Garland, 2005); uno de los mecanismos propuestos es que estos canales incrementan la concentración de calcio citosólico, que puede participar en la activación de la eNOS (Yao and Garland, 2005). Se ha descrito que la BK incrementa la expresión del TRPC6, modulando sus efectos (Leung *et al.*, 2006). Las Vi, al inhibir a la PLC, previenen también la formación de DAG, lo que podría intervenir en la activación de canales TRPC, siendo este otro posible mecanismo por el cual las Vi ejercen sus efectos antiangiogénicos.

Como ya habíamos mencionado, la activación de la eNOS también es regulada por fosforilación. La formación del complejo calcio-calmodulina por activación de los receptores de BK, activa a la cinasa CAMKII la cual a su vez fosforila a la eNOS en el residuo de serina 1177. Otro mecanismo por el cual la BK promueve la fosforilación de la eNOS es la activación de la vía de PI3K/Akt. Esta cascada de señalización se puede activar por la transactivación del receptor de VEGF por el receptor B2 de la BK (Venema, 2002). La fosforilación incrementa considerablemente la actividad basal de la eNOS, contribuyendo a los efectos proangiogénicos de la BK. Otro de los hallazgos de este trabajo es el efecto inhibitorio de las Vi sobre la fosforilación de la eNOS inducida por la BK (Figura 7). En el 2008, García y colaboradores demostraron que las Vi bloquean la activación de la eNOS inducida por VEGF, a través de la desfosforilación del residuo de serina 1179 (secuencia bovina), efecto modulado por la PP2A (García *et al.*, 2008). Este podría ser el mismo mecanismo por el cual las Vi bloquean la fosforilación de la eNOS inducida por la BK.

En este trabajo hemos demostrado que las Vi inhiben la proliferación endotelial inducida por BK, al bloquear la producción de NO de dos maneras: (1) inhibiendo la activación de la PLC, responsable de la movilización de calcio, y (2) bloqueando la fosforilación de la eNOS en el residuo de serina 1179. Estos hallazgos ayudarán a comprender y enriquecer la información que se tiene sobre los mecanismos intracelulares mediante los cuales las Vi modulan sus efectos antiangiogénicos. El comprender cómo es que los factores pro- y antiangiogénicos modulan el crecimiento de nuevos vasos

sanguíneos es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra patologías donde existe un crecimiento anormal de vasos sanguíneos, como es el caso de la retinopatía diabética. Resulta prometedor el hecho que las Vi regulan a dos de los múltiples factores implicados en la patogénesis de la retinopatía diabética.

## 9. Conclusiones

Las Vi inhiben la proliferación de las células endoteliales BUVEC estimulada con BK de manera dosis-dependiente, efecto que involucra la producción de NO.

Las Vi inhiben la activación de la fosfolipasa C inducida por la BK en las células endoteliales BUVEC y con ello la producción de IP<sub>3</sub>.

Las Vi revierten la fosforilación de la eNOS en el residuo Ser<sup>1179</sup> así como la producción de NO inducida por la BK.

## 10. Referencias

Abdoun M, Talbot S, Couture R and Hassessian H M (2008). Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol* 154(1): 136-143.

Ahluwalia A and Perretti M (1999). B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B be the 1? *Trends Pharmacol Sci* 20(3): 100-104.

Aiello L P, Avery R L, Arrigg P G, Keyt B A, Jampel H D, Shah S T, Pasquale L R, Thieme H, Iwamoto M A, Park J E and et al. (1994). Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331(22): 1480-1487.

Alderton W K, Cooper C E and Knowles R G (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357(Pt 3): 593-615.

Aranda J, Rivera J C, Jeziorski M C, Riesgo-Escovar J, Nava G, Lopez-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martinez de la Escalera G and Clapp C (2005). Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(8): 2947-2953.

Arnal J F, Yamin J, Dockery S and Harrison D G (1994). Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *Am J Physiol* 267(5 Pt 1): C1381-1388.

Baldocchi R A, Tan L, King D S and Nicoll C S (1993). Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133(2): 935-938.

Bloomgarden Z T (2007). Screening for and managing diabetic retinopathy: current approaches. *Am J Health Syst Pharm* 64(17 Suppl 12): S8-14.

Busse R and Mulisch A (1990). Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 265(1-2): 133-136.

Campochiaro P A (2000). Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 184(3): 301-310.

Carmeliet P (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438(7070): 932-936.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380(6573): 435-439.

Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski M C and Martinez de la Escalera G (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 17(8): 301-307.

Clapp C, Martial J A, Guzman R C, Rentier-Delure F and Weiner R I (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133(3): 1292-1299.

Clapp C, Thebault S, Arnold E, Garcia C, Rivera J C and de la Escalera G M (2008). Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(4): E772-778.

Clapp C, Thebault S, Jeziorski M C and Martinez De La Escalera G (2009). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89(4): 1177-1215.

Clapp C and Weiner R I (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130(3): 1380-1386.

Colman R W, Pixley R A, Sainz I M, Song J S, Isordia-Salas I, Muhamed S N, Powell J A, Jr. and Mousa S A (2003). Inhibition of angiogenesis by antibody blocking the action of proangiogenic high-molecular-weight kininogen. *J Thromb Haemost* 1(1): 164-170.

Corbacho A M, Nava G, Eiserich J P, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martinez De La Escalera G, Freeman B A and Clapp C (2000). Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem* 275(18): 13183-13186.

Crawford T N, Alfaro D V, 3rd, Kerrison J B and Jablon E P (2009). Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev* 5(1): 8-13.

Chen L, Endler A and Shibasaki F (2009). Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp Mol Med* 41(12): 849-857.

Cheng H W, James A F, Foster R R, Hancox J C and Bates D O (2006). VEGF activates receptor-operated cation channels in human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(8): 1768-1776.

D'Angelo G, Martini J F, Iiri T, Fantl W J, Martial J and Weiner R I (1999). 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol* 13(5): 692-704.

D'Angelo G, Struman I, Martial J and Weiner R I (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14): 6374-6378.

Das A and McGuire P G (2003). Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res* 22(6): 721-748.

Dhanabal M and Sethuraman N (2006). Endogenous angiogenesis inhibitors as therapeutic agents: historical perspective and future direction. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 1(2): 223-236.

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M and Zeiher A M (1997). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 185(4): 601-607.

Duenas Z, Rivera J C, Quiroz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, Lopez-Barrera F, Nava G, Guerrero J L, Suarez A, De Regil M, Martinez de la Escalera G and Clapp C (2004). Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(7): 2049-2055.

Emerson M V and Lauer A K (2007). Emerging therapies for the treatment of neovascular age-related macular degeneration and diabetic macular edema. *BioDrugs* 21(4): 245-257.

Feil R, Feil S and Hofmann F (2005). A heretical view on the role of NO and cGMP in vascular proliferative diseases. *Trends Mol Med* 11(2): 71-75.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea K S, Powell-Braxton L, Hillan K J and Moore M W (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380(6573): 439-442.

Ferrara N, Gerber H P and LeCouter J (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9(6): 669-676.

Fleming I and Busse R (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(1): R1-12.

Folkman J (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med* 57: 1-18.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun C O, Buerk D G, Huang P L and Jain R K (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2604-2609.

Furchgott R F and Zawadzki J V (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789): 373-376.

Gao B B, Clermont A, Rook S, Fonda S J, Srinivasan V J, Wojtkowski M, Fujimoto J G, Avery R L, Arrigg P G, Bursell S E, Aiello L P and Feener E P (2007). Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med* 13(2): 181-188.

Garcia C, Aranda J, Arnold E, Thebault S, Macotela Y, Lopez-Casillas F, Mendoza V, Quiroz-Mercado H, Hernandez-Montiel H L, Lin S H, de la Escalera G M and Clapp C (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 118(6): 2291-2300.

Gardner T W and Antonetti D A (2007). A prize catch for diabetic retinopathy. *Nat Med* 13(2): 131-132.

Gariano R F and Gardner T W (2005). Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438(7070): 960-966.

Ge G, Fernandez C A, Moses M A and Greenspan D S (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24): 10010-10015.

Geraldes P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, Aiello L P, Kern T S and King G L (2009). Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med* 15(11): 1298-1306.

Geva E and Jaffe R B (2000). Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 74(3): 429-438.

Gonzalez C, Corbacho A M, Eiserich J P, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Diaz-Munoz M, Rubio R, Lin S H, Martinez de la Escalera G and Clapp C (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 145(12): 5714-5722.

Groothuis P G (2005). Angiogenesis and vascular remodelling in female reproductive organs. *Angiogenesis* 8(2): 87-88.

Gupta K and Zhang J (2005). Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J* 81(954): 236-242.

Hammes H P (2005). Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* 37 Suppl 1: 39-43.

Han Q, Leng J, Bian D, Mahanivong C, Carpenter K A, Pan Z K, Han J and Huang S (2002). Rac1-MKK3-p38-MAPKAPK2 pathway promotes urokinase plasminogen activator mRNA stability in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem* 277(50): 48379-48385.

Hayashi I, Amano H, Yoshida S, Kamata K, Kamata M, Inukai M, Fujita T, Kumagai Y, Furudate S and Majima M (2002). Suppressed angiogenesis in kininogen-deficiencies. *Lab Invest* 82(7): 871-880.

Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A, Funami J, Ding Q F, Kamalanathan S, Hattori Y, Ignarro L J and Iguchi A (2006). Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(45): 17018-17023.

Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, Forster O, Quint A, Landmesser U, Doerries C, Luchtefeld M, Poli V, Schneider M D, Balligand J L, Desjardins F, Ansari A, Struman I, Nguyen N Q, Zschemisch N H, Klein G, Heusch G, Schulz R, Hilfiker A and Drexler H (2007). A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128(3): 589-600.

Ignarro L J, Byrns R E, Buga G M, Wood K S and Chaudhuri G (1988). Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 244(1): 181-189.

Jain R K (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9(6): 685-693.

Kamei M, Saunders W B, Bayless K J, Dye L, Davis G E and Weinstein B M (2006). Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* 442(7101): 453-456.

Knudsen S T, Bek T, Poulsen P L, Hove M N, Rehling M and Mogensen C E (2002). Macular edema reflects generalized vascular hyperpermeability in type 2 diabetic patients with retinopathy. *Diabetes Care* 25(12): 2328-2334.

Lamallice L, Le Boeuf F and Huot J (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100(6): 782-794.

Lee S H, Lee Y J and Han H J (2010). Role of FAK phosphorylation in hypoxia-induced hMSCs migration: involvement of VEGF as well as MAPKs and eNOS pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*.

Lee S H, Nishino M, Mazumdar T, Garcia G E, Galfione M, Lee F L, Lee C L, Liang A, Kim J, Feng L, Eissa N T, Lin S H and Yu-Lee L Y (2005). 16-kDa prolactin down-regulates inducible nitric oxide synthase expression through inhibition of the signal transducer and activator of transcription 1/IFN regulatory factor-1 pathway. *Cancer Res* 65(17): 7984-7992.

Leung P C, Cheng K T, Liu C, Cheung W T, Kwan H Y, Lau K L, Huang Y and Yao X (2006). Mechanism of non-capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in response to bradykinin in vascular endothelial cells. *J Vasc Res* 43(4): 367-376.

Liesmaa I, Leskinen H K, Kokkonen J O, Ruskoaho H, Kovanen P T and Lindstedt K A (2009). Hypoxia-induced expression of bradykinin type-2 receptors in endothelial cells triggers NO production, cell migration, and angiogenesis. *J Cell Physiol* 221(2): 359-366.

Losordo D W and Isner J M (2001). Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(1): 6-12.

Macotella Y, Aguilar M B, Guzman-Morales J, Rivera J C, Zermeno C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martinez de la Escalera G and Clapp C (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* 119(Pt 9): 1790-1800.

Martini J F, Piot C, Humeau L M, Struman I, Martial J A and Weiner R I (2000). The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol* 14(10): 1536-1549.

Mikoshiha K (2007). IP3 receptor/Ca<sup>2+</sup> channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* 102(5): 1426-1446.

Miura S, Matsuo Y and Saku K (2003). Transactivation of KDR/Flk-1 by the B2 receptor induces tube formation in human coronary endothelial cells. *Hypertension* 41(5): 1118-1123.

Mohamed Q, Gillies M C and Wong T Y (2007). Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA* 298(8): 902-916.

Morbidelli L, Parenti A, Giovannelli L, Granger H J, Ledda F and Ziche M (1998). B1 receptor involvement in the effect of bradykinin on venular endothelial cell proliferation and potentiation of FGF-2 effects. *Br J Pharmacol* 124(6): 1286-1292.

Mott J D and Werb Z (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16(5): 558-564.

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes J F, Fishman M C, Huang P L and Isner J M (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101(11): 2567-2578.

Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo D W and Isner J M (1999). Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(5): 1156-1161.

Musicki B, Ross A E, Champion H C, Burnett A L and Bivalacqua T J (2009). Posttranslational modification of constitutive nitric oxide synthase in the penis. *J Androl* 30(4): 352-362.

Myers D E and Larkins R G (1989). Bradykinin-induced changes in phosphoinositides, inositol phosphate production and intracellular free calcium in cultured bovine aortic endothelial cells. *Cell Signal* 1(4): 335-343.

Niluis B and Droogmans G (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81(4): 1415-1459.

Nyberg P, Xie L and Kalluri R (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 65(10): 3967-3979.

Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M and Honda Y (1999). Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 274(22): 15732-15739.

Parekh A B and Putney J W, Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85(2): 757-810.

Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, Granger H J and Ziche M (2001). The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *Faseb J* 15(8): 1487-1489.

Phipps J A, Clermont A C, Sinha S, Chilcote T J, Bursell S E and Feener E P (2009). Plasma kallikrein mediates angiotensin II type 1 receptor-stimulated retinal vascular permeability. *Hypertension* 53(2): 175-181.

Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial J A, Kelly P A and Goffin V (2004). Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol* 18(10): 2522-2542.

Pombo C, Bokser L, Casabiell X, Zugaza J, Capeans M, Salorio M and Casanueva F (1996). Partial characterization of a putative new growth factor present in pathological human vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234(3): 155-163.

Poulaki V, Jousseaume A M, Mitsiades N, Mitsiades C S, Iliaki E F and Adamis A P (2004). Insulin-like growth factor-I plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 165(2): 457-469.

Pugh C W and Ratcliffe P J (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9(6): 677-684.

Reynolds J D (2001). The management of retinopathy of prematurity. *Paediatr Drugs* 3(4): 263-272.

Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386(6626): 671-674.

Schilling W P, Rajan L and Strobl-Jager E (1989). Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. Saturability, selectivity, and kinetics. *J Biol Chem* 264(22): 12838-12848.

Schmetterer L and Polak K (2001). Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. *Prog Retin Eye Res* 20(6): 823-847.

Searles C D, Miwa Y, Harrison D G and Ramasamy S (1999). Posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase during cell growth. *Circ Res* 85(7): 588-595.

Simo R, Lecube A, Segura R M, Garcia Arumi J and Hernandez C (2002). Free insulin growth factor-I and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 134(3): 376-382.

Sorrentino G, Singh I N, Massarelli R and Kanfer J N (1996). Stimulation of phospholipase C activity by norepinephrine, t-ACPD and bombesin in LA-N-2 cells. *Eur J Pharmacol* 308(1): 81-86.

Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner R I and Martial J A (1999). Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1246-1251.

Szekanecz Z and Koch A E (2008). Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'. *Arthritis Res Ther* 10(5): 224.

Tabruyn S P, Nguyen N Q, Cornet A M, Martial J A and Struman I (2005). The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases. *Mol Endocrinol* 19(7): 1932-1942.

Tabruyn S P, Sorlet C M, Rentier-Delrue F, Bours V, Weiner R I, Martial J A and Struman I (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 17(9): 1815-1823.

Thomas D D, Ridnour L A, Isenberg J S, Flores-Santana W, Switzer C H, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolucci N, Ambs S, Colton C A, Harris C C, Roberts D D and Wink D A (2008). The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 45(1): 18-31.

Thorin E, Huang P L, Fishman M C and Bevan J A (1998). Nitric oxide inhibits alpha2-adrenoceptor-mediated endothelium-dependent vasodilation. *Circ Res* 82(12): 1323-1329.

Triebel J, Huefner M and Ramadori G (2009). Investigation of prolactin-related vaso-inhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol* 161(2): 345-353.

Urbich C, Reissner A, Chavakis E, Dernbach E, Haendeler J, Fleming I, Zeiher A M, Kaszkin M and Dimmeler S (2002). Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *Faseb J* 16(7): 706-708.

Velnar T, Bailey T and Smrkolj V (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 37(5): 1528-1542.

Venema R C (2002). Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *Int Immunopharmacol* 2(13-14): 1755-1762.

Wang X, Wang G and Wang Y (2009). Intravitreal vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1a in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 148(6): 883-889.

Wirostko B, Wong T Y and Simo R (2008). Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res* 27(6): 608-621.

Yao X and Garland C J (2005). Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res* 97(9): 853-863.

Young B C, Levine R J and Karumanchi S A (2010). Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol* 5: 173-192.

Zachary I and Glikli G (2001). Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 49(3): 568-581.

Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U and Liang O D (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1: S10-18.

## Índice de figuras

Figura 1.	Ilustración de las etapas necesarias para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos: desestabilización de los capilares, generación de brotes vasculares, ramificación y estabilización	3
Figura 2.	Efecto de la BK sobre la proliferación de células BUVEC	20
Figura 3.	Efecto de las Vi sobre la proliferación de células BUVEC inducida por BK	21
Figura 4.	Análisis del efecto de un donador de NO, el DET-ANONOato, sobre la proliferación de células BUVEC tratadas con BK y Vi	22
Figura 5.	Análisis del efecto de las Vi sobre la actividad de la PLC inducida por BK en células BUVEC	23
Figura 6.	Análisis del efecto de las Vi sobre la producción de IP <sub>3</sub> inducida por BK en células BUVEC	24
Figura 7.	Análisis del efecto de las Vi sobre la fosforilación de eNOS inducida por BK en células BUVEC	25
Figura 8.	Análisis del efecto de las Vi sobre la producción de NO inducida por la BK en células BUVEC	25

## Índice de Tablas

Tabla 1.	Algunos factores pro- y antiangiogénicos	5
----------	--	---