



Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LAS VASOINHIBINAS SOBRE LAS ACCIONES NEUROTRÓFICAS DEL VEGF Y EL NGF EN EL GANGLIO DE LA RAIZ DORSAL DE LA RATA”**

Tesis

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

P r e s e n t a

Ximena Castillo Tovar

Director de tesis

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Campus Juriquilla, Querétaro.

Octubre 2010.



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 Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Ximena Castillo Tovar, cuyo título es: “Caracterización del efecto de las vasoinhibinas sobre las acciones neurotróficas del VEGF y el NGF en el ganglio de la raíz dorsal de la rata” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestra 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**

**Dra. María Teresa Morales Guzmán**

**Secretario**

**Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo**

**Vocal**

**Dra. María de la Luz Torner Aguilar**

**Suplentes**

**Dr. Víctor Ramírez Amaya**

**Dr. Alfredo Varela Echavarría**

**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 UNAM, bajo la tutoría del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera y con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la UNAM.

## RESUMEN

Las vasoinhibinas son una familia de péptidos generados por proteólisis de hormonas que ejercen varios efectos en el endotelio vascular, tales como la inhibición de la dilatación, la permeabilidad y la proliferación de células endoteliales, al interferir con las cascadas de señalización activadas por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El VEGF es una glicoproteína ampliamente estudiada en relación con sus potentes efectos sobre la vasoproliferación y la vasopermeabilidad. Sin embargo, el VEGF también promueve la migración, la proliferación y la supervivencia de distintos tipos celulares en el sistema nervioso. Por otra parte, el factor de crecimiento neural (NGF) es considerada la neurotrofina prototípica, conociéndose que puede regular la migración de las neuronas diferenciadas, en lugar de la proliferación de las mismas. En nuestro trabajo se cuantificó la actividad neurotrófica del VEGF y del NGF sobre explantes de ganglios de la raíz dorsal (DRG), y particularmente el posible antagonismo ejercido por las vasoinhibinas. Se observó un incremento en la densidad neurítica en respuesta a distintas concentraciones del VEGF y del NGF (3.125 y 6.25 nM). La co-incubación con vasoinhibinas (1, 5 y 10 nM) redujo la densidad del crecimiento neurítico inducido por ambos factores de crecimiento. Estos resultados muestran por vez primera un efecto a nivel celular de las vasoinhibinas sobre el sistema nervioso periférico. Nosotros concluimos que las vasoinhibinas antagonizan el efecto neurotrófico del VEGF, de manera similar a lo observado en el endotelio vascular, y también el efecto neurotrófico del NGF. Las cascadas de señalización a través de las cuales las vasoinhibinas bloquean éstos efectos neurotróficos aun deben ser dilucidadas.

## SUMMARY

Vasoinhibins are a family of peptides generated by the proteolysis of hormones such as prolactin, growth hormone, and placental lactogen. Vasoinhibins exert various effects on blood vessels, including the inhibition of dilation, permeability, and endothelial cell proliferation by interfering with signaling cascades activated by VEGF. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a glycoprotein with potent vasoproliferation and vasopermeability effects. Moreover, VEGF promotes the migration, proliferation, and survival of different cell types in the nervous system, including neural stem cells. Neural growth factor (NGF) is considered the prototypical neurotrophin that regulates the migration of differentiated neurons rather than their proliferation. Our work quantified the neurotrophic activity of VEGF and NGF in dorsal root ganglion (DRG) explants and its putative antagonism by vasoinhibins. An increase in the density of the neuritic outgrowth was observed in response to VEGF and NGF (1.25, 3.125 and 6.25 nM). Co-incubation with vasoinhibins (1, 5, and 10 nM) reduced the density of the neuritic growth induced by both growth factors. These results show for the first time an action of vasoinhibins on the peripheral nervous system. We conclude that vasoinhibins antagonize the neurotrophic effects of VEGF, perhaps in a manner similar to that seen in endothelial cells, as well as those of NGF. The signaling cascades by which vasoinhibins block these neurotrophic effects remains to be elucidated.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología por permitir la realización de mis estudios de maestría, así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, cuenta No: 509003182.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, becario No: 220936.

A mi tutor, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, por recibirme en su equipo de trabajo e introducirme en el fascinante mundo de la ciencia básica.

A la Dra. Edith Garay Rojas, por sus atinadas sugerencias y correcciones a lo largo de la realización del proyecto. Al Dr. Alfredo Varela Echavarría por fungir no sólo como mentor sino como amigo. Gracias también a la Dra. Elisa Tamariz, sin cuya valiosa ayuda quizás esta empresa no se habría alcanzado.

A las responsables de la unidad de microscopía, Lic. Elsa Nydia Hernández Rios y Ma. Lourdes Palma Tirado, por mostrarme el secreto mundo de la microscopía confocal, por su infinita paciencia y camaradería.

A la Mtra. Leonor Casanova Rico, coordinadora del posgrado, por tener la mejor de las actitudes al responder diez veces la misma pregunta, por ser de las pocas personas que siempre vi trabajando... y sonriente.

Al MVZ. Martín García Servín, responsable del Bioterio, al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, coordinador de la biblioteca del campus Juriquilla y a Román Pacheco Barrita, de los servicios bibliotecarios, por el impecable servicio brindado durante mi estancia en el instituto.

A Antonio Prado Galán, por actualizarme en política nacional mientras me ayudaba con las soluciones, al Lic. Fernando López Barrera, por no desesperar mientras me revelaba las virtudes del Photoshop y al Dr. Michael Conrad Jeziorsky por compartir su adicción a Los Sopranos.

A todos los compañeros de los laboratorios de Endocrinología molecular y Neuroendocrinología de la reproducción (A-14 y A-15), por la grata experiencia de compartir tanto los reactivos como las historias. A Steph y a Isa, por tolerarme codo a codo, por compartir risas, abrazos, galletas y café. Por todo.

A Candy, por los oportunos recordatorios de la entrega de las prácticas, por tus maravillosas nemotecnias y dibujos ilustrativos, por enseñarme a distinguir foraminíferos y rodofitas, porque alguien debía de poner el orden en esa casa. A Angélica, por compartir las bondades de los baños de sol, el humor negro y la fascinación por el mar, por el millar de cigarros y cafés y las eternas horas de plática que los acompañaron, por no dejarte vencer. A Irma, por tener la mejor de las actitudes estudiando de madrugada, por compartir las carcajadas sonoras, las galletas sopeadas y tu inmenso amor por los animales. Me las llevo conmigo.

A Mariana, Ismael, Lalo, Daniel, Mario, Miguel, Benjamín, Pepe, Germán, David y Paco, por compartir fiestas, viajes y noches de dominó cubano, por ayudarme a perfeccionar la técnica de repujado, por ser amigos y compañeros de este intrincado viaje. Por hacer de ésta etapa una experiencia inolvidable.

Finalmente, a Dafne, Karla y Miguel, por permanecer a pesar del tiempo y la distancia.



## ***Dedicatoria***

A mis padres,  
por enseñarme a volar y ser el aire bajo mis alas.

A Iliana,  
Porque con tu ejemplo vas marcando el paso.  
Porque “todo pasa por algo”

# ÍNDICE

Resumen	iv
Summary	v
<b>Capítulo 1: Introducción</b>	
1.1 Generalidades del Sistema Nervioso	1
1.2 Interacción entre el Sistema Nervioso y el Sistema Vascul	2
1.3 Factores de crecimiento	3
1.4 Factores neurotróficos	4
<b>Capítulo 2: Antecedentes</b>	
2.1 Factor de Crecimiento Neural	5
2.1.1 NGF en el Sistema Vascul	6
2.2 Factor de Crecimiento del Endotelio Vascul	6
2.2.1 Familia de VEGF	
2.2.1.1 VEGF-A	7
2.2.1.2 VEGF-B	11
2.2.1.3 VEGF-C	12
2.2.1.4 VEGF-D	13
2.2.1.5 Factor de Crecimiento Placentario	13
2.2.2 Regulación de la expresión génica de VEGF	
2.2.2.1 Hipoxia	14
2.2.2.2 Citocinas	14
2.2.3 VEGF en el Sistema Nervioso	14

2.3 Vasoinhibinas	17
2.3.1 Vasoinhibinas en el Sistema Vascolar	17
2.3.2 Vasoinhibinas en el Sistema Nervioso	18
<b>Capítulo 3: Justificación</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo 4: Hipótesis</b>	<b>21</b>
<b>Capítulo 5: Objetivos</b>	
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos	22
<b>Capítulo 6: Materiales y métodos</b>	
6.1 Verificación del crecimiento de neuritas	
6.1.1 Disección de DRGs	23
6.1.2 Explantes de DRGs	23
6.1.3 Obtención de colágena de cola de rata	23
6.1.4 Colocación de explantes de DRGs en botón de colágena	24
6.1.5 Cultivos primarios	24
6.1.6 Tratamiento con el VEGF	24
6.1.7 Tratamiento con el NGF	24
6.1.8 Incubación con Faloidina Rodaminada	25
6.1.9 Inmunohistoquímica	25
6.1.10 Visualización del crecimiento de las neuritas	26
6.1.11 Cuantificación del crecimiento de las neuritas	26

6.1.12 Análisis estadístico	26
6.2 Co-incubación de VEGF y Vasoinhibinas	
6.2.1 Tratamiento con las vasoinhibinas	26
6.2.2 Co-incubación de VEGF y vasoinhibinas en explantes de DRGs	27
6.2.3 Disociación de los DRGs	27
6.2.4 Co-incubación de VEGF y vasoinhibinas en células de DRGs	27
6.3 Co-incubación de NGF y Vasoinhibinas	
6.3.1 Co-incubación de NGF y vasoinhibinas en explantes de DRGs	28
 <b>Capítulo 7: Resultados</b>	
7.1 Estudio piloto con revelado de Faloidina-Rodaminada	29
7.2 Determinación del efecto neurotrófico del VEGF en explantes de DRGs	30
7.3 Determinación del efecto neurotrófico del NGF en explantes de DRGs	32
7.4 Efecto de las Vasoinhibinas y del VEGF sobre las neuritas en explantes de DRGs	33
7.5 Efecto de las Vasoinhibinas y del NGF sobre las neuritas en explantes de DRGs	36
7.6 Efecto de las Vasoinhibinas y del VEGF sobre las neuritas en células disociadas de DRGs	37
 <b>Capítulo 8: Discusión de resultados</b>	
8.1 Verificación del crecimiento neurítico inducido por la administración tanto del VEGF como del NGF en explantes de DRGs de ratas en período neonatal	39
8.2 Análisis del efecto sobre el crecimiento de neuritas de la co-incubación con distintas concentraciones de Vasoinhibinas y VEGF en explantes de DRGs de ratas en período neonatal	40

8.3 Análisis del efecto sobre el crecimiento de neuritas de la co-incubación con distintas concentraciones de Vasoinhibinas y NGF en explantes de DRGs de ratas en período neonatal	41
8.4 Análisis de efecto sobre el crecimiento de neuritas de la co-incubación con distintas concentraciones de vasoinhibinas y VEGF en neuronas sensoriales de DRGs de ratas en período neonatal	42
<b>Capítulo 9: Conclusión</b>	<b>43</b>
<b>Capítulo 10: Referencias bibliográficas</b>	<b>44</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>50</b>

## **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

Considerando la información existente sobre la estrecha relación anatómica que guardan el sistema vascular y el sistema nervioso periférico, el propósito del presente proyecto fue el de explorar un posible regulador común para el desarrollo de estos dos sistemas. Con este propósito estudiamos en el ganglio de la raíz dorsal, un modelo de sistema nervioso periférico (SNP), a dos de los factores reguladores de la fisiología de los sistemas vascular y nervioso mejor caracterizados, como lo son el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) y el Factor de Crecimiento Neural (Nerve Growth Factor, NGF) y particularmente, la interacción funcional que se pudiese presentar entre dichos factores y las Vasoinhibinas (Vi), péptidos hasta ahora descritos con una serie de importantes efectos en la fisiología vascular, opuestos a los evocados por el VEGF sobre el endotelio vascular, pero sin ningún antecedente sobre posibles acciones en la esfera del sistema nervioso.

### ***1.1 Generalidades del Sistema Nervioso***

Las funciones del sistema nervioso son controladas en su nivel más básico por la neurona. El hecho de que cada neurona se diferencie en un momento y un lugar particular adoptando un fenotipo característico, permite que se presente una enorme diversidad de funciones y conexiones en el sistema nervioso adulto.

En los vertebrados, todas las células del sistema nervioso derivan de la placa neural. Hacia el final de la gastrulación, la placa neural comienza a doblarse y formar el tubo neural. Las células de la cresta neural migran a partir de la parte dorsal del tubo neural y dan origen a neuronas sensoriales. Las células que permanecen en el tubo neural dan origen a estructuras cerebrales y de la médula espinal que comprenden el sistema nervioso central (SNC) (Wolpert et al., 2007).

## ***1.2 Interacción entre el sistema nervioso y el sistema vascular***

Desde hace aproximadamente cinco siglos, el anatomista belga Andreas Vesalius documentó el paralelismo entre el endotelio vascular y el sistema nervioso. A simple vista, el sistema nervioso y el sistema vascular parecen ser tanto estructural como funcionalmente diferentes. Sin embargo, ambos sistemas comparten múltiples similitudes: durante el desarrollo, tanto el sistema nervioso como el endotelio vascular emiten proyecciones a larga distancia para alcanzar sus áreas blanco, a donde son guiadas por gradientes de factores de crecimiento. Para hallar el camino correcto, células endoteliales especializadas que se encuentran en la punta de los vasos, así como el cono de crecimiento de las neuronas, extienden filopodios que sensan el ambiente en su camino a lo largo del organismo. Así mismo, se sabe que los vasos endoteliales y los axones siguen rutas paralelas en la periferia y al parecer la interacción entre ambos sistemas es bidireccional (Lazarovici et al., 2006).

Una vez completado el desarrollo de los sistemas vascular y nervioso, la generación de nuevos vasos o neuronas se limita a algunos procesos fisiológicos en áreas delimitadas. Una correlación interesante es que la neurogénesis se lleva a cabo en nichos vasculares donde también proliferan células endoteliales (Taupin, 2005). Además, muchas neuropatologías se asocian a su vez con patologías cerebrovasculares. Una mala perfusión, el crecimiento de vasos endoteliales aberrantes o la ruptura de la barrera hematoencefálica, son factores determinantes de enfermedades tales como la enfermedad vascular cerebral, la esclerosis múltiple, la demencia de inicio tardío, la degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética, lo cual permite suponer una dependencia del sistema nervioso de la vasculatura (Zacchinga et al., 2008).

En base a lo anterior, se cree que el desarrollo y la homeostasis de ambos sistemas son controlados por los mismos factores de crecimiento y sus receptores. Estudios recientes han reportado que tanto el sistema vascular como el sistema nervioso comparten una variedad de factores de crecimiento, lo cual sugiere la evolución de los mismos mecanismos moleculares que controlan la emisión de filopodios que les

permiten encontrar rutas estereotípicas, el patrón espacial, la proliferación y la supervivencia.

En los últimos años, el número de factores de crecimiento reportados como compartidos en ambos sistemas se ha incrementado considerablemente. Entre éstos, se incluyen al VEGF, las efrinas y la familia de los factores de crecimiento neurotrofinas (Raab y Plate, 2007).

### **1.3 Factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento son importantes sustancias reguladoras cuya presencia se ha reportado tanto en vertebrados como en invertebrados e inclusive en plantas, en donde son conocidos como agentes biológicamente activos denominados citocininas. Representan las señales biológicas involucradas en la regulación del crecimiento celular y la diferenciación, así como en el control de procesos metabólicos específicos durante la vida prenatal y postnatal. Ciertos factores de crecimiento actúan de manera restrictiva en un tipo celular específico, mientras que otros muestran un amplio espectro de actividad en distintos tipos celulares.

Se sabe que los factores de crecimiento son producidos y secretados tanto por células normales como neoplásicas *in vivo* e *in vitro* en una gran variedad de tejidos. Con frecuencia se liberan en sitios cercanos a sus células blanco, dando lugar a respuestas parácrinas y en ocasiones autócrinas (Haigh et al., 2003). Sin embargo, algunos factores de crecimiento, o productos proteolíticos de los mismos, pueden circular en la sangre y actuar en sitios lejanos. Son considerados componentes necesarios para la supervivencia y el crecimiento de células cultivadas *in vitro*, protegiendo a las células de la muerte. Además, los factores de crecimiento se involucran en la supervivencia celular *in vivo* y desempeñan un papel crucial en los mecanismos de control del desarrollo de órganos y tejidos (Pimentel, 1994).

Además de su acción como promotores del crecimiento e inductores de diferenciación, los factores de crecimiento pueden llevar a cabo una gran variedad de



efectos en las células sensibles a los mismos (células blanco), incluyendo diversos efectos metabólicos. Se han implicado en importantes procesos fisiológicos, tales como inflamación, reacciones inmunes y reparación de tejidos (Pimentel, 1994). A los factores de crecimiento con efectos específicos sobre el tejido nervioso se les ha denominado factores neurotróficos.

#### ***1.4 Factores neurotróficos***

La diversidad celular en el sistema nervioso es producto de procesos concertados de proliferación celular, diferenciación, migración, supervivencia y formación de sinapsis. La adhesión neural y las moléculas de matriz extracelular han mostrado desempeñar papeles clave en la migración y guía axonal, así como en el establecimiento de sinapsis. La familia de factores neurotróficos y de cinasas de tirosina (Trk) han aportado importantes claves para entender la transducción de las señales neuronales (Skaper et al., 1998).

## CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES

### **2.1 Factor de crecimiento neural (NGF)**

Descubierto por su habilidad para inducir el crecimiento, diferenciación y supervivencia de neuronas periféricas durante el desarrollo embrionario, el NGF es la neurotrofina prototípica que define las propiedades y funciones de esta clase de factores de crecimiento. Existen dos características únicas de las acciones del NGF en neuronas, opuestas a las acciones de otros factores de crecimiento en otros tipos celulares. En primer lugar, el NGF regula funciones de neuronas diferenciadas como el crecimiento en lugar de la proliferación. En segundo lugar, el NGF es sintetizado a una distancia considerable del cuerpo celular neuronal o soma por tejidos periféricos y otras neuronas blanco, que son contactadas por los axones de las neuronas sensibles al NGF. En el SNP, las fuentes tisulares del NGF (y otros factores neurotróficos) normalmente son células no neuronales, mientras que en el SNC son sintetizados predominantemente por neuronas bajo condiciones fisiológicas. Durante el desarrollo, se establece un flujo retrógrado del NGF de la célula blanco a la terminación nerviosa y a través del axón, al cuerpo celular. Aquellas neuronas que establecen este flujo sobreviven el periodo de muerte neuronal, mientras que aquellas que no lo hacen, degeneran. Una vez establecido el flujo retrógrado del NGF, éste debe continuar para desarrollar y mantener el estado diferenciado de la neurona.

El fenómeno generalizado de muerte programada posterior a la deprivación de blancos (axotomía) sugiere que la mayoría de las neuronas responden o son regulados por factores neurotróficos. Esta hipótesis fue validada por el aislamiento subsecuente de un segundo factor neurotrófico, denominado factor neurotrófico derivado del cerebro (brain-derived nerve factor, BDNF), capaz de permitir la supervivencia de neuronas sensoriales pero no simpáticas. Estudios posteriores revelaron que el gen del BDNF era estructuralmente similar al del NGF, derivando en el concepto de familia de neurotrofinas. Mediante estudios de homología, se descubrieron algunos miembros adicionales como la neurotrofina-3 y la neurotrofina-4 que comparten aproximadamente el 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos (Nico et al., 2008).

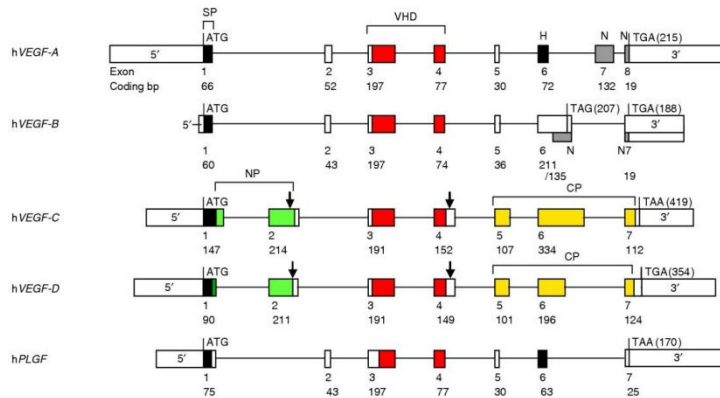
Los efectos biológicos del NGF dependen directamente de su unión a receptores de superficie celular: TrkA y p75. El TrkA es una cinasa de tirosina transmembranal de 140-kDa, que es el receptor específico para el NGF y es fosforilado en residuos de tirosina posterior a la unión con su ligando. El p75 es una glicoproteína de 75-kDa, miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral y la cual también es conocida como receptor pan neurotrofina porque se puede unir con baja afinidad no sólo al NGF sino también a otras neurotrofinas. Por su parte, la fosforilación del TrkA activa una cascada de señalización vía la activación de las vías de ERK1/2 y fosfatidil-3'cinasa / Akt, derivando en la estimulación de la proliferación celular (Raab y Plate, 2007).

### 2.1.1 NGF en sistema vascular.

En cuanto a los efectos del NGF sobre el endotelio vascular, Lambiase y colaboradores (2000) demostraron que se encuentran receptores de NGF en cultivos de células endoteliales, cuya activación influye sobre la biología celular de la vasculatura (Lambiase et al., 2000). Por su parte, Cantarella y colaboradores (2002) mostraron que el NGF estimula la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana y la expresión en dicha células de los receptores TrkA y p75 por análisis de RT-PCR y Western-blot (Cantarella et al., 2002).

## **2.2 Factor de crecimiento del endotelio vascular.**

El VEGF es una glicoproteína que fue purificada y clonada por Dvorak y colaboradores en 1983, basados en sus actividades como un inductor de la permeabilidad vascular y como un mitógeno de las células endoteliales. Fue identificado en un cultivo condicionado de células agranulares en la adenohipófisis del bovino y en una variedad de líneas celulares transformadas. También se identificó como factor de permeabilidad vascular en un cultivo de líneas celulares tumorales en



**Fig. 1** Estructura de los genes que codifican para la expresión de distintos miembros de la familia del VEGF (Ijijn et al., 2001)

VEGF-A, el VEGF-B, el VEGF-C, el VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (Fig. 1). Estas glicoproteínas son a su vez miembros de una superfamilia estructural de factores de crecimiento que contienen cisteína e incluyen al factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) y al factor de crecimiento transformante  $\beta 2$  (TGF $\beta 2$ ).

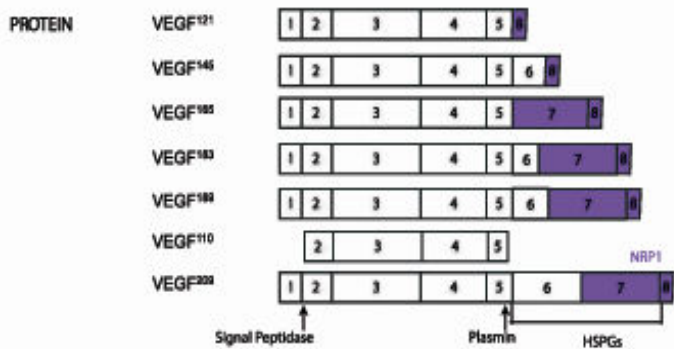
base a su habilidad para inducir fuga vascular. Posteriormente se descubrió su función como promotor del crecimiento celular endotelial (Ferrara et al., 1992).

En los mamíferos, los miembros de la familia del VEGF conocidos son el

## 2.2.1 FAMILIA DEL VEGF

### 2.2.1.1 VEGF-A

También conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF), es una glicoproteína homodimérica de 34 a 46 kD con actividad mitogénica originalmente considerada como altamente específica para células del endotelio vascular y un potente inductor de permeabilidad vascular. El gen del VEGF-A humano posee ocho exones separados por siete intrones y se localiza en el cromosoma 6p21.3 (Fig.1). Los monómeros del VEGF-A se encuentran unidos por puentes disulfuro formando homodímeros. El exón 1 y parte del exón 2 codifican la secuencia de la señal hidrofóbica, los exones 3 y 4 codifican los dominios responsables de la unión a su receptor, mientras que los exones 6 y 7 codifican los dominios básicos capaces de unirse a la heparina (Ruiz de Almodovar et al., 2009). Las isoformas del VEGF humano son generadas por splicing alternativo del ARN mensajero del VEGF-A y son de 121, 145, 165, 189 y 206



**Fig. 2** Distintas isoformas del VEGF-A generadas por Splicing alternativo (Ruiz de Almodovar et al., 2009).

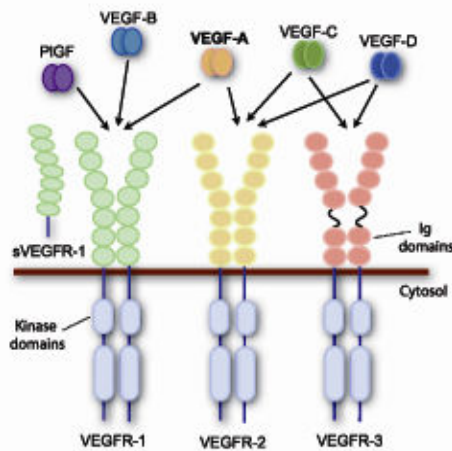
aminoácidos (Fig. 2). El VEGF<sub>165</sub> es la isoforma predominante secretada por diversos tipos celulares, sin embargo, transcritos del VEGF<sub>121</sub> y del VEGF<sub>189</sub> son detectadas en la mayoría de los tejidos que expresan el gen del VEGF-A. En contraste, el VEGF<sub>145</sub> y el VEGF<sub>206</sub> son más restrictivos en su expresión. Las 4 isoformas más largas del VEGF-A se unen a heparina, lo cual afecta su bio-disponibilidad; el VEGF<sub>121</sub> se difunde libremente dado que carece de los residuos de aminoácidos responsables de la unión a heparina. Cuando la isoforma del VEGF<sub>165</sub> es secretada, una proporción de la proteína permanece asociada con la superficie de la matriz extracelular (MEC). Así mismo, las isoformas VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub> permanecen casi completamente unidas a la MEC (Achen y Stacker, 1998). Dichas isoformas son liberadas de la MEC por proteinasas, como heparinasas y metaloproteasas de matriz (MMPs), con lo cual contribuyen a la regulación tanto de la forma como del número de vasos sanguíneos. Debido a su distinta afinidad por la matriz extracelular, las isoformas del VEGF-A muestran un gradiente de distribución espacial del VEGF para el patrón de los vasos sanguíneos, con la isoforma VEGF<sub>121</sub> difundiéndose a grandes distancias, el VEGF<sub>165</sub> alcanzando blancos celulares intermedios, y la isoforma unida a la MEC, el VEGF<sub>189</sub> respondiendo a señales a distancias cortas.

Se han identificado tres receptores altamente afines para el VEGF: el VEGFR-1 (también llamado Flt1, fms-like tyrosine kinase), el VEGFR-2 (también llamado Flk1 - fetal liver kinase- en ratón y KDR en el humano), y el VEGFR3 (Flt4), pertenecientes a la familia de receptores membranales con actividad de cinasas de tirosina (Fig.3). Además de dichos receptores, se ha descrito que las neuropilinas (NRPs) 1 y 2 pueden funcionar como co-receptores de los distintos miembros de la familia del VEGF (Prahst et al., 2008). Los receptores del VEGF (VEGFRs) contienen siete asas de tipo inmunoglobulinas (Ig) en su parte extracelular (excepto el VEGFR3 que contiene sólo

seis) y un dominio con actividad de cinasa de tirosinas en su región intracelular. El segundo y tercer dominio tipo Ig median la unión del ligando, mientras que los dominios cuarto y séptimo median la dimerización del receptor.

El VEGFR1 y el VEGFR2 se localizan en las células endoteliales desde el desarrollo embrionario. El VEGFR-3 se expresa durante el desarrollo embrionario en los angioblastos del mesénquima de la cabeza, la vena cardinal y el alantoides; mientras que en el tejido adulto se encuentra de manera casi exclusiva en el endotelio linfático (Iljin et al., 2001).

El VEGFR1 y el VEGFR2 difieren en varios aspectos. El VEGFR2, que está mejor caracterizado, tiene una importante actividad de cinasa de tirosina y dirige la



**Fig. 3** Receptores del VEGF y sus respectivos ligandos (Ruiz de Almodovar et al., 2009).

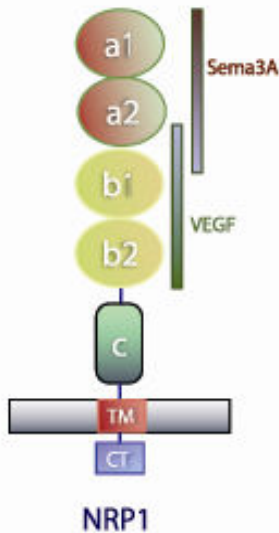
angiogénesis tanto en procesos fisiológicos como en procesos patológicos; estimula la proliferación de células endoteliales, la migración, la navegación de las células guía, la supervivencia y la permeabilidad vascular. En el sistema nervioso, dicho receptor también estimula la migración, la proliferación y la supervivencia de varios tipos celulares (Ruiz de Almodovar et al., 2009).

Aunque el VEGFR1 fue el primer receptor del VEGF descrito, su función aun no es tan conocida. Mediante un proceso de splicing alternativo, el VEGFR1 da lugar a dos isoformas, una localizada en la membrana (mFlt-1) y una isoforma soluble (sFlt-1) que es secretada por las células endoteliales. La isoforma soluble actúa como un anclaje de ligando para modular la cantidad del VEGF-A disponible para la unión con el VEGFR2. Así mismo, la forma transmembranal del receptor tiene una actividad débil de cinasa de tirosina, pero adecuada afinidad a la proteína. Por lo tanto, ambas isoformas del VEGFR1 actúan como un receptor “señuelo” que evita la activación excesiva del VEGFR2 al atrapar al VEGF circulante. Este parece ser el caso durante el desarrollo, dado que embriones que carecen del

VEGFR1 mueren debido a la desorganización del sistema vascular (Hiratsuka et al., 1998).

Otra clase de receptores del VEGF son las NRPs, las cuales son glicoproteínas de superficie celular que fueron inicialmente identificadas como proteínas de adhesión en el sistema nervioso central y posteriormente como receptores de la clase 3 de semaforinas (sema 3A), una familia de polipéptidos involucrados en la dirección axonal que se expresan además en células endoteliales y varios tipos de células tumorales (Cheng et al., 2004).

En 1996, Soker y colaboradores reportaron el hallazgo de un receptor específico a la isoforma VEGF<sub>165</sub>, al que denominaron VEGF<sub>165</sub>R.



Posteriormente, el mismo grupo de investigación purificó y clonó dicho receptor, concluyendo que se trataba de la NRP1, lo que indicaba que dos ligandos estructuralmente diferentes y con marcadas diferencias en sus respectivas actividades biológicas (estimulación de la angiogénesis por el VEGF y quimiorrepulsión de células neuronales por la clase 3 de Semaforinas) se unen al mismo receptor con afinidad similar (Soker et al., 1998).

**Fig. 4** Estructura molecular de la NRP1 con los sitios de unión para sus distintos ligandos (Ruiz de Almodovar et al., 2009).

La NRP1 es una glucoproteína de un solo paso transmembranal con dominios extracelulares A y B necesarios para la unión a las semaforinas, mientras que sólo el dominio B es necesario para la unión del VEGF (Fig. 4). El dominio B también se une a heparina, incrementado

de esta manera la interacción del VEGF con la NRP1. Aunque las semaforinas interactúan directamente con las plexinas, la clase 3 de las semaforinas (sema 3A a F) se unen a neuropilinas y forman complejos con las plexinas y de ésta manera se inicia la transducción de las señales. La semaforina 3A se une a su receptor e induce el colapso del cono de crecimiento mediante la NRP-1, mientras que las semaforinas 3B,

3C, 3E y 3F reconocen ambas neuropilinas, actuando sobre las NRP-1 como antagonistas y sobre las NRP-2 como agonistas (Cheng et al., 2004).

El dominio C de la NRP1 es importante para la oligomerización con el VEGFR2. Algunos estudios demuestran que el VEGF<sub>165</sub> y el VEGF<sub>189</sub> se unen a la NRP1, pero no el VEGF<sub>121</sub> que carece del exón 7, el cual codifica para el sitio de unión a la NRP1. La NRP2 interactúa con el VEGF<sub>145</sub> y el VEGF<sub>165</sub> (Ruiz de Almodovar et al., 2009).

Las neuropilinas incrementan la señalización del VEGF al actuar como co-receptores para los receptores del VEGF. Cuando se co-expresan con el VEGFR2, éstos se asocian con la NRP1 y se amplifica la fosforilación y señalización del VEGFR2. Las NRPs contienen un dominio intracelular de unión a las proteínas PDZ que interactúa con proteínas intracelulares, como la sinectina. La delección del dominio de unión a PDZ disminuye la formación de complejos entre la NRP1 y el VEGFR2, disminuyendo la respuesta de las células endoteliales al VEGF<sub>165</sub>, sugiriendo que la sinectina actúa como un puente entre las NRPs y las moléculas intracelulares de señalización (Prahst et al., 2008).

Durante el desarrollo, la expresión de la NRP1 se restringe a vasos arteriales, mientras que la NRP2 se expresa en vasos venosos y linfáticos. Embriones murinos deficientes en la NRP1 son letales debido a defectos en el sistema vascular, incluyendo alteraciones en la vascularización neuronal y un remodelamiento vascular anormal. En contraste, los embriones que carecen de la NRP2 son viables, no mostrando evidencia de defectos cardiovasculares, aunque los pequeños vasos linfáticos y capilares no se forman. La pérdida de la sinectina tanto en ratón como en el pez cebra, ocasiona defectos arteriales específicos (Prahst et al., 2008).

#### 2.2.1.2 VEGF-B

También conocido como factor relacionado al VEGF (-A) (VEGF related factor, VRF), comparte aproximadamente un 44% de similitud con la secuencia de aminoácidos del VEGF-A. Se une al VEGFR-1, con el cual forma homodímeros unidos por puentes



disulfuro y existen dos tipos de isoformas que constan de 167 y 186 aminoácidos. También se ha reportado su unión a la NRP1. Estas isoformas difieren en secuencia sólo en la región carboxilo terminal. El VEGF-B<sub>167</sub> se une a la heparina y permanece predominantemente asociado a las células, mientras el VEGF-B<sub>186</sub> se secreta de forma libre desde las células. Se ha reportado que el VEGF-B<sub>167</sub> estimula la proliferación de células endoteliales *in vitro* y el proceso de angiogénesis *in vivo* (Achen and Stacker, 1998). Sin embargo, la potencia de dichos efectos es menor que la inducida por el VEGF-A. Se ha encontrado la expresión del gen del VEGF-B durante el desarrollo embrionario en el tejido cardíaco; en tejido adulto se ha demostrado la expresión de dicho gen en el músculo cardíaco y esquelético. Sin embargo, de acuerdo con Aase y colaboradores, los ratones VEGF-B<sup>-/-</sup> aunque muestran anomalías en el desarrollo y la función cardíaca, son viables y fértiles, indicando que el VEGF-B no es indispensable para los procesos de vasculogénesis o de angiogénesis (Aase et al., 2001).

### 2.2.1.3 VEGF – C

También conocido como proteína relacionada a VEGF-A (VEGF related protein, VRP), se reportó originalmente como un ligando para el VEGFR3 (flt4). La secuencia de aminoácidos del VEGF-C tiene una región central, relacionada con otros miembros de la familia del VEGF y contiene aproximadamente un 30% de similitud con la secuencia de aminoácidos del VEGF-A. Además, la secuencia del VEGF-C tiene extensiones N-terminal y C-terminal que no se encuentran presentes en el VEGF-A, en el VEGF-B o en el factor de crecimiento placentario (PIGF).

El VEGF-C induce permeabilidad vascular y es mitogénico para las células endoteliales *in vitro*, aunque menos potente que el VEGF-A. La expresión génica del VEGF-C es inducida por numerosas citocinas pro-inflamatorias, pero no por la hipoxia.

Durante el brote del endotelio linfático, en la embriogénesis, el patrón de la expresión génica del VEGF-C se relaciona con la expresión génica del VEGFR3, sugiriendo que estas moléculas constituyen un sistema parácrino que regula la

angiogénesis de la vasculatura linfática. También se une al VEGFR2 aunque con menor afinidad, y no se une al VEGFR1. Así mismo, se ha reportado su unión a la NRP2.

#### 2.2.1.4 VEGF-D

Este miembro de la familia se encuentra cercanamente relacionado con el VEGF-C en su estructura primaria, teniendo un dominio central homólogo al VEGF-A y extensiones N- y C- terminal. El VEGF-D y el VEGF-C comparten un 31% de identidad de aminoácidos. El dominio homólogo con el VEGF-A muestra mayor similitud que aquel que comparte con el VEGF-C (61% de identidad en secuencia de aminoácidos). La región de su terminal-C es rica en residuos de cisteína y por ésta vía puede interactuar con proteínas ligadas a la membrana.

El VEGF-D se une y activa tanto al VEGFR2 como al VEGFR3 y su capacidad para unirse a dichos receptores está asociada (como en el caso del VEGF-C) con el dominio homólogo al VEGF. También se ha reportado su unión a la NRP2. En el humano adulto, la transcripción del VEGF-D se encuentra en varios tejidos, siendo más abundante en pulmón y corazón.

#### 2.2.1.5 Factor de crecimiento placentario

El factor de crecimiento placentario (PIGF) es una proteína homodimérica unida por puentes disulfuro que posee aproximadamente un 46% de identidad con la secuencia de aminoácidos del VEGF-A y que se une y activa al VEGFR1 pero no al VEGFR2, pudiendo formar heterodímeros con el VEGF-A. Se han caracterizado 3 isoformas del PIGF, de las cuales sólo una, la PIGF-2, se une a la heparina. El gen del PIGF se expresa predominantemente en la placenta y se piensa que sus homodímeros son pobremente mitogénicos para las células endoteliales *in vitro* y extremadamente permeables en comparación con el VEGF (Achen y Stacker, 1998). Se ha reportado que la forma del PIGF que se une a la heparina también se puede unir a la NRP1 y la NRP2.

## 2.2.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL VEGF

### 2.2.2.1 Hipoxia

El oxígeno juega un papel importante en la regulación de la expresión génica del VEGF, tanto *in vivo* como *in vitro*. La expresión del ARNm del VEGF es rápida y reversiblemente inducida por la exposición a baja presión de O<sub>2</sub>. El factor inductor de hipoxia-1 (HIF-1) es un factor de transcripción que regula la homeostasis del oxígeno al unirse al elemento de respuesta a hipoxia (HRE) que se encuentra en el promotor del VEGF. Éste también es inducido en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento y a la señalización por calcio, mediando respuestas adaptativas a dicha hipoxia; dicho factor también está implicado en la activación de la transcripción del gen del VEGF cuando ocurre acumulación de adenosina, lo cual sucede bajo condiciones hipóxicas. De acuerdo a diversos estudios, al activar a los receptores A<sub>2</sub> de adenosina se producen concentraciones elevadas de AMPc lo que incrementa los niveles del ARNm del VEGF (Ferrara et al., 1992).

### 2.2.2.2 Citocinas

Diversos estudios han probado que la exposición de las células que producen el VEGF al factor de crecimiento epidermal (EGF), al TGF- $\beta$  o al factor de crecimiento keratinocítico, resulta en una marcada inducción de la expresión del ARNm del VEGF; por esto, se ha propuesto que el VEGF podría funcionar como un mediador parácrino para los agentes angiogénicos que actúan de forma indirecta.

## 2.2.3 VEGF EN EL SISTEMA NERVIOSO

En la década de los 90's, Silvermann y colaboradores realizaron parte de los estudios pioneros del efecto de la aplicación del VEGF en el neuropilo del SNC. Utilizando un explante mesencefálico fetal en medio libre de suero, la administración de

la isoforma 165 del VEGF-A indujo una respuesta angiogénica dependiente de la dosis, así como un crecimiento profuso de las neuritas, en comparación con los explantes sin tratamiento. Dichos resultados llevaron a los autores a concluir que la aplicación del VEGF a explantes del SNC, como podría estar ocurriendo *in situ*, podría mediar el crecimiento y la interacción de varios tipos celulares en el neuropilo del SNC (Silvermann et al., 1999). La administración del VEGF también mostró un efecto mitogénico significativo en células gliales positivas a la tinción de la proteína fibrilar acídica glial (GFAP [+]) que expresaban el receptor VEGFR-2 (Silvermann et al., 1999).

Por su parte, Sondell y colaboradores demostraron un efecto similar del tratamiento con el VEGF utilizando neuronas del SNP. El trabajo de dicho grupo consistió en la incubación de explantes de ganglios de la raíz dorsal y cervical superior de ratas adultas en presencia de distintas concentraciones del VEGF, observando crecimiento axonal e incremento en la supervivencia celular mediante la reducción de la apoptosis neuronal y de células de Schwann. Además del crecimiento axonal inducido por la incubación con el VEGF en un medio libre de suero, reportaron un efecto aditivo con la administración de una baja concentración del NGF. Los efectos de crecimiento y supervivencia disminuyeron al utilizar el PD98059, un inhibidor de la vía de señalización de las MAPK, sugiriendo que dichos efectos eran mediados a través del receptor VEGFR-2 (Sondell et al., 1999). Posteriormente, el mismo grupo demostró la expresión del ARNm del VEGFR2 en cultivos de neuronas tanto del ganglio cervical superior como de ganglios de la raíz dorsal (Sondell et al., 2000). En sus experimentos observaron que la expresión del VEGFR2 se incrementó después del cultivo, así como también posterior a una lesión *in vivo*. Reportaron además que el crecimiento axonal inducido por el VEGF fue bloqueado por el SU5416, un inhibidor específico del VEGFR2.

En relación al papel que desempeña el VEGF-A durante el desarrollo del sistema nervioso, Yang y Cepko demostraron la expresión del receptor VEGFR2 en células progenitoras neuronales y algunas células diferenciadas durante el desarrollo de la retina del ratón en un estadio avascular. Reportaron además que el VEGF-A se expresaba en células adyacentes a aquellas que expresaban el VEGFR2, lo que

implicaba un papel directo en la neurogénesis y el desarrollo de la retina. Dicho efecto directo fue confirmado por estudios *in vitro* utilizando células de la retina aisladas de ratas recién nacidas, en las cuales el VEGF-A incrementó el número tanto de fotorreceptores como de células amácrinas (Yang y Cepko, 1996).

La expresión neuronal del VEGFR1 y el VEGFR2 en el cerebro de ratas, tanto en células endoteliales como en neuronas, fue demostrado por Yang y colaboradores. Sin embargo, dos grupos independientes, Haigh y colaboradores y Hiratsuka y colaboradores no hallaron cambios patológicos en cerebros de ratas en las que se eliminó (knockout) el VEGFR2 en células neuronales del cerebro en desarrollo, ni en ratones con señalización deficiente del VEGFR1 (Yang et al., 2003; Haigh et al., 2003; Hiratsuka et al., 1998). Estos resultados sugieren que la señalización neuronal desencadenada por los receptores del VEGF durante el desarrollo, no desempeña una función esencial en la proliferación, diferenciación o supervivencia. Sin embargo, los efectos neuronales directos del VEGF-A podrían ser necesarios para la definición fina del proceso de desarrollo del sistema nervioso.

Otros estudios han sugerido un papel para el VEGF en la regeneración de nervios periféricos. Hobson y colaboradores demostraron que la aplicación del VEGF en un modelo de regeneración del nervio ciático, promueve la mielinización de los axones en un 78% e incrementa también, de forma esperada, la angiogénesis. Éstos resultados motivaron a los autores a concluir que existía una cercana interacción entre la regeneración nerviosa y los vasos sanguíneos (Hobson et al., 2000).

Schratzberger y colaboradores, utilizando un modelo de isquemia de miembro trasero de conejo que asemeja la neuropatía isquémica periférica que se presenta en humanos, demostraron que la transferencia génica intramuscular directa de un plásmido que codifica para el VEGF, permitía una recuperación funcional, tanto motora como periférica (Schratzberger et al., 2000).

Oosthuyse y colaboradores generaron un ratón “knock-in” en el cual eliminaron el HRE del promotor del VEGF. De esta forma, la expresión del VEGF (y por ende la angiogénesis) fue reducida a nivel de médula y nervios espinales, ocasionando

degeneración de neuronas motoras y atrofia muscular, modelo similar a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en ratones homocigóticos (Oosthuyse et al., 2001). Posterior a estos resultados, el mismo grupo realizó un análisis multicéntrico de 2000 individuos en Europa, encontrando que aquellos individuos homocigóticos con respecto a halotipos específicos en la secuencia promotora del VEGF presentaban un riesgo incrementado en cerca del 80% de presentar ELA. Además, a pesar de su genotipo, todos los individuos que presentaron una forma esporádica de ELA mostraron una reducción del 50% en los niveles plasmáticos del VEGF, mientras que aquellos con halotipos “de riesgo” de presentar la enfermedad, mostraban reducciones aun mayores de los niveles plasmáticos de la proteína, así como una menor actividad transcripcional y traduccional (Lambrechts et al., 2003).

### **2.3 Vasoinhibinas**

Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados de la prolactina, la hormona de crecimiento y del lactógeno placentario, que actúan a nivel endotelial suprimiendo la dilatación y la angiogénesis al promover la apoptosis. Estos fragmentos anti-angiogénicos tienen masas moleculares diferentes, todas conteniendo la región amino terminal, al menos en el caso de la prolactina (Clapp et al., 2006).

La prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH) y el lactógeno placentario humano (PL), son proteínas de 22-23 kDa de 199 (PRL) o 191 residuos (GH-PL), forman cuatro hélices  $\alpha$  y contienen ya sea dos (GH y PL) o tres (PRL) puentes disulfuro. Los fragmentos amino terminales anti-angiogénicos de los péptidos son generados por una hendidura proteolítica en la conexión entre la tercera y la cuarta hélice  $\alpha$ , comprendiendo residuos de 138 – 160 en PRL y de 129 – 153 en la GH y PL.

#### 2.3.1 Vasoinhibinas en el sistema vascular

Se sabe que las vaso inhibinas bloquean varios pasos del proceso de angiogénesis mediante la interferencia con la actividad del VEGF, inhibición de la sintetasa endotelial del óxido nítrico y la estimulación de la apoptosis celular endotelial (Clapp et al., 2006).

En el contexto de la proliferación celular, las vaso inhibinas pueden intervenir tanto en la transición de G0 – G1 como en G2 – M, mediante la inhibición de las ciclinas D1 y B1. Esto puede reflejar inhibición de la vía de la cinasa de proteínas activada por mitosis (MAPK) debido a que las vaso inhibinas bloquean la activación de MAPK inducida por el VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a nivel de Ras. También se ha documentado el bloqueo de la actividad de la sintetasa endotelial del óxido nítrico (eNOS) inducida por el VEGF (García et al., 2008).

En 1995 Torner y colaboradores demostraron que fragmentos de PRL de 14 kilodaltones (kDa) eran producidos de manera local en las neuronas magnocelulares de los núcleos supraópticos y paraventriculares por proteólisis y reducción de la PRL de 23 kDa, y liberadas de las terminales nerviosas neurohipofisarias a la circulación. También demostraron que los fragmentos de 14 kDa contenían los determinantes antiangiogénicos de la PRL 23 kDa, como en el caso de los fragmentos de 16 kDa. Determinaron que los fragmentos de 14 kDa se encontraban en la neurohipófisis pero no en la adenohipófisis, indicando la existencia de algún mecanismo de anclaje específico que opera para la formación de la molécula de 14 kDa de PRL en el sistema hipotálamo – neurohipofisario (Torner et al., 1995).

### 2.3.2 Vaso inhibinas en el sistema nervioso

Es extraordinariamente escasa la información disponible sobre la posible participación de las vaso inhibinas en la esfera del sistema nervioso. No existe ningún reporte sobre acciones a nivel del desarrollo, y solo se conocen algunos datos sobre acciones centrales medidas a nivel funcional integral, sin datos celulares ni moleculares. Se sabe por datos inéditos del laboratorio de la Dra. C. Clapp, que las vaso inhibinas hipotalámicas participan en la respuesta aguda al estrés (Zamorano M, comunicación personal). La inmovilización de las ratas durante 30 minutos incrementó

la expresión de las proteínas tanto de PRL como de vasoinhibinas en el hipotálamo. La adición de Bromocriptina, un agonista dopaminérgico que disminuye los niveles de PRL sistémica, también redujo el incremento de los niveles de PRL y vasoinhibinas hipotalámicas en respuesta al estrés agudo. Además, la incubación de extractos hipotalámicos de ratas estresadas con PRL exógena derivó en un incremento en la producción de vasoinhibinas hipotalámicas, comparado con extractos de ratas no estresadas, revelado por análisis de Western-blot. Éstos resultados sugieren que bajo condiciones de estrés agudo, el incremento en la PRL circulante resulta en una mayor producción de vasoinhibinas. Además, a nivel funcional, las vasoinhibinas ejercen un efecto ansiogénico en varias tareas de comportamiento. Éstos resultados muestran que las vasoinhibinas son potentes mediadores de estrés y ansiedad en el cerebro.

Al momento actual, se desconocen los efectos que pudiesen ejercer dichos fragmentos de prolactina (vasoinhibinas) en la morfología del sistema nervioso, ya que su estudio se ha centrado principalmente en los efectos a nivel del endotelio vascular, no pudiéndose aun caracterizar a su receptor.



### **CAPÍTULO 3: JUSTIFICACIÓN**

Las señales que determinan el crecimiento tanto de vasos como de nervios, se cree que son compartidas entre los sistemas vascular y nervioso. Considerando que muchas de las patologías neurodegenerativas involucran la disfuncionalidad tanto del endotelio vascular como de células del sistema nervioso, la identificación de dichas señales ha tomado especial relevancia en la investigación biomédica de los últimos años.

En el presente proyecto nos interesó dilucidar si el antagonismo de los efectos del VEGF-A con las vasoinhibinas presente en el sistema vascular se observa también en el sistema nervioso periférico, utilizando como modelo a los ganglios de la raíz dorsal dado que fue en dicho modelo en el cual se realizaron las primeras observaciones del efecto neurotrófico del VEGF (Sondell et al., 1999; Sondell et al., 2000). Así mismo, nos interesa saber si las vasoinhibinas son capaces de antagonizar también a otros factores, como lo es el NGF, con robustos efectos en el sistema nervioso. Esto nos permitirá determinar si éstas son señales compartidas entre el sistema vascular y el sistema nervioso, que nos permitan entender los mecanismos celulares que regulan el crecimiento y mantenimiento fisiológico de ambos sistemas.

## **CAPÍTULO 4: HIPÓTESIS**

Las vasoinhibinas antagonizan los efectos neurotróficos tanto del VEGF como del NGF en neuronas de ganglios de la raíz dorsal de la rata.

## **CAPÍTULO 5: OBJETIVOS**

### ***5.1 Objetivo General***

Evaluar el efecto sobre el crecimiento de neuritas por la co-incubación de vasoinhibinas con VEGF o NGF en explantes y neuronas de ganglios de la raíz dorsal (DRGs) de la rata en período neonatal.

### ***5.2 Objetivos específicos***

5.2.1 Verificar el crecimiento de neuritas inducido por la administración tanto del VEGF como del NGF en explantes de DRGs de ratas en período neonatal.

5.2.2 Analizar el efecto sobre el crecimiento de neuritas de la co-incubación con distintas concentraciones de vasoinhibinas y VEGF en explantes de DRGs de ratas en período neonatal.

5.2.3 Analizar el efecto sobre el crecimiento de neuritas de la co-incubación con distintas concentraciones de vasoinhibinas y NGF en explantes de DRGs de ratas en período neonatal.

5.2.4 Analizar el efecto de la co-incubación con distintas concentraciones de vasoinhibinas y VEGF en cultivos de neuronas de DRGs de ratas en período neonatal.

## CAPÍTULO 6: MATERIALES Y MÉTODOS

### **6.1 Verificación del crecimiento de neuritas en DRGs.-**

*6.1.1 Disección de DRGs.-* Se utilizan ratas Wistar, de día 1 postnatal, los cuales son sacrificados mediante la pérdida rápida de la conciencia por CO<sub>2</sub> sin hipoxia y posterior decapitación. Una vez sacrificadas las ratas, con ayuda de un microscopio óptico se disecciona por capas la región dorsal del animal hasta alcanzar el canal vertebral, el cual se disecciona sagitalmente para permitir la visualización y remoción de los ganglios de la raíz dorsal, que se encuentran a los lados de dicho canal.

*6.1.2 Explantes de DRGs.-* Los DRGs diseccionados se colocan en un plato de Petri de 6 cm de diámetro que contiene solución Ringer (NaCl 140mM, Glucosa 23mM, Hepes 15mM, KCl 2mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, fenol al 1%, pH 7.4 y osmolaridad 300-310) el cual se mantiene tapado y en hielo mientras se obtienen todos los ganglios. Posteriormente, aun auxiliándose con el microscopio óptico, se realiza limpieza y corte del contorno de los ganglios procurando el menor daño posible a los mismos.

*6.1.3 Obtención de colágeno de cola de rata.-* Se utilizan colas de rata adulta, las cuales se almacenan durante su recolección a -20°C. Se sumergen las colas de rata en etanol al 70% por 5 minutos y se dejan secar. Se extraen los tendones con pinzas cromadas o quirúrgicas y se sumergen en etanol al 70%. Una vez que se obtienen 5 gramos de tendones, se cortan en fragmentos de 0.5 centímetros de longitud. Se dejan evaporar los restos de etanol sin dejar secar completamente el tejido. Se transfieren los tendones cortados a un matraz que contiene 150ml de ácido acético frío al 0.1%. Con ayuda de un agitador magnético, se agita lentamente durante 20 horas a 4°C. Se diluye con 200ml de agua desionizada estéril mezclando suavemente. Se centrifuga en tubos

de fondo cónico de 50ml a 9000rpm por 30 minutos a 4°C, se transfiere el sobrenadante a tubos de 15ml y se almacena a 4°C.

*6.1.4 Colocación de explantes de DRGs en botón de colágena.*- Posterior a la limpieza de los DRGs, cada explante fue colocado en un plato de 4 pozos (NUNC) embebido en un botón de 30 µl que contenía medio de cultivo DMEM (GIBCO) con 25% de colágena de cola de rata que contenía 8.5 µg/ml de proteína, 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO) al 10,000 U/ml de penicilina y 10,000µg/ml de estreptomicina, 7.5% de bicarbonato de sodio y 2.5% de Cloruro de sodio a una concentración de 1.5mM. Se permite la polimerización de dicho botón mediante su incubación durante 45 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>.

*6.1.5 Cultivos primarios.*- Posterior a la polimerización del botón de colágena en que fueron embebidos los DRGs, cada explante se cultivó en 250 µl de medio que contenía Medio Neurobasal (GIBCO), el suplemento B27 (GIBCO) al 2%, 0.25% de L-Glutamina (GIBCO) a una concentración de 200mM y 1% de penicilina-estreptomicina a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> por 24, 48 ó 72 horas.

*6.1.6 Tratamiento con el VEGF.*- Se utilizó VEGF-A recombinante humano donado por Genentech a concentraciones de 1.25nM, 3.125 nM o 6.25 nM. El VEGF fue incorporado al momento del cultivo con 250µl de medio Neurobasal suplementado e incubado a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> ya fuese durante 24, 48 o 72 horas. Los explantes control fueron incubados únicamente en 250µl medio neurobasal suplementado e igualmente mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> durante los mismos períodos de tiempo.

*6.1.7 Tratamiento con el NGF.*- Las concentraciones utilizadas de NGF (Sigma-Aldrich) fueron 1.25nM, 3.125nM o 6.25nM, las cuales fueron incorporadas al momento del cultivo con 250µl de medio Neurobasal suplementado y mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> ya fuese durante 24, 48 o 72 horas. Los explantes control fueron incubados únicamente con 250µl medio neurobasal suplementado e

igualmente mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> durante los mismos períodos de tiempo.

*6.1.8 Incubación con Faloidina Rodaminada.*- Una vez concluido el período de incubación con el medio Neurobasal suplementado y los distintos factores de crecimiento, los explantes fueron fijados mediante su inmersión en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos sin agitación a temperatura ambiente, posterior a lo cual, utilizando una espátula se desprendieron del pozo los botones de colágena y se mantuvieron 10 minutos más en PFA en agitación suave. Se realizaron 3 lavados de 5 min con solución amortiguadora fosfosalina (PBS) y se incubaron en oscuridad durante 1 hora con faloidina rodaminada 1:300 (Molecular Probes). Una vez concluida la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS en oscuridad y se montaron las muestras en portaobjetos debidamente rotulados utilizando como medio de montaje glicerol/PBS a una concentración de 1:1 para observación en microscopía de fluorescencia.

*6.1.9 Inmunohistoquímica.*- Posterior a la incubación con las distintas concentraciones del VEGF o del NGF en Medio Neurobasal suplementado, los explantes de los DRGs se fijaron mediante la inmersión en PFA al 4% durante 20 minutos sin movimiento y posterior al desprendimiento de los mismos, se mantuvieron durante 10 minutos más en PFA en agitación suave a temperatura ambiente, realizándose después 3 lavados de 5 minutos con PBS en agitación. Se bloquearon las muestras durante 1 hora con suero de cabra al 5% diluido en PBS en agitación suave a temperatura ambiente y un lavado posterior de 10 min en agitación suave con PBS. Se incubaron las muestras a 4°C con el anticuerpo primario anti  $\beta$ -tubulina clase III neuronal (Covance) a una concentración de 1:1500 en suero de cabra al 5%, tritón 0.1% y PBS en agitación suave durante la noche. Se realizaron 6 lavados de 10 min con PBS en agitación suave, e incubaron en oscuridad con el anticuerpo secundario Alexa 488 hecho en cabra y que reconoce IgG de ratón (Invitrogen) a una concentración de 1:500 por 1 hora. Por último, se realizaron 6 lavados de 10 min con

PBS en agitación vigorosa y las muestras se montaron en glicerol/PBS a una concentración de 1:1 para observación en microscopía confocal.

*6.1.10 Visualización del crecimiento de neuritas.*- Utilizando un microscopio confocal Nikon, se capturaron imágenes de los cuatro cuadrantes de los explantes completos y cada 2 $\mu$ m a través del eje Z, para llevar a cabo aplastamiento de las imágenes y construcción de imágenes en mosaico de los mismos utilizando el programa de software Adobe Photoshop CS.

*6.1.11 Cuantificación del crecimiento de neuritas.*- El crecimiento de las neuritas se evaluó mediante el programa de software Image pro plus utilizando como medida indirecta del incremento en la densidad de las mismas, la cantidad de pixeles reportados por dicho programa. Para evitar el ruido de los pixeles que se reportaban en el cuerpo de los DRGs, éstos fueron oscurecidos utilizando el programa Photoshop CS y tomando el ruido de fondo de cada explante como coloración de base para el oscurecimiento.

*6.1.12 Análisis estadístico.*- Los datos aportados por el software Image Pro Plus fueron analizados con el programa SigmaStat por ANOVA de dos vías y una prueba posthoc de Bonferroni, reportándose como media +/- error estándar. La significancia estadística se asumió con una  $p < 0.05$ .

## **6.2 Co-incubación de VEGF y Vasoinhibinas.-**

*6.2.1 Tratamiento con las Vasoinhibinas.*- Se utilizaron las concentraciones de 1nM, 5nM y 10nM de Vasoinhibinas (Vi) las cuales fueron incorporadas al momento del cultivo con 250 $\mu$ l de medio Neurobasal suplementado y mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Los explantes control fueron incubados únicamente con 250 $\mu$ l medio neurobasal suplementado e igualmente

mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Se utilizaron vasoinhibinas recombinantes de 16K de PRL humana producidas en células de insecto en el laboratorio del Dr. Fernando López Casillas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM de acuerdo a la técnica reportada por Galfione y colaboradores (Galfione et al., 2003).

*6.2.2 Co-incubación de VEGF y vasoinhibinas en explantes de DRGs.*- Los explantes fueron co-incubados con ya fuese 1nM, 5nM o 10nM de Vi y 3.125nM de VEGF en 250µl de medio neurobasal suplementado y mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, posterior a las cuales las muestras se fijaron e incubaron para realizar inmunohistoquímica utilizando como anticuerpo primario anti β-tubulina clase III neuronal (Covance). Tanto la técnica de inmunohistoquímica como el análisis posterior de las imágenes y el procesamiento de los datos se llevó a cabo de la misma manera que el efectuado en el procesamiento de los experimentos de dosis-respuesta con VEGF.

*6.2.3 Disociación de los DRGs.*- Se realizó la disociación de los DRGs de rata de día 1 postnatal, mediante la incubación de los DRGs disecados con 3 ml de tripsina-EDTA (GIBCO) al 0.05% a 37°C en baño maría por una hora con agitación suave cada 15 minutos. La inactivación de la tripsina se realizó con medio de cultivo DMEM (GIBCO) que contenía suero fetal bovino al 10% y 5% de penicilina-estreptomicina. Posteriormente, se centrifugó a 1000 rpm durante 3 minutos y se reemplazó el medio que contenía tripsina y DMEM por 3ml de medio Neurobasal suplementado en el cual se llevó a cabo la disociación mecánica utilizando para dicho propósito una pipeta Pasteur hasta que se observó un homogenado celular. Las células recuperadas fueron sembradas en cubreobjetos de plástico (LUX) de 15mm previamente colocados en placas de Petri de 24 pozos y tratados durante una hora con 100µl de laminina de humano (SIGMA) al 10 µg/ml.



*6.2.4 Co-incubación de VEGF y vasoinhibinas en células disociadas.*- Las células fueron co-incubados con ya fuese 1nM, 5nM o 10nM de Vi y 3.125nM de VEGF en 250µl de medio neurobasal suplementado y mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, posterior a las cuales las muestras se fijaron e incubaron con el anticuerpo anti β-tubulina clase III neuronal (Covance) para realizar inmunohistoquímica. La técnica de inmunohistoquímica, el análisis posterior de las imágenes y el procesamiento de los datos se llevó de la manera previamente descrita en los experimentos de dosis-respuesta de VEGF.

### **6.3 Co-incubación de NGF y Vasoinhibinas.-**

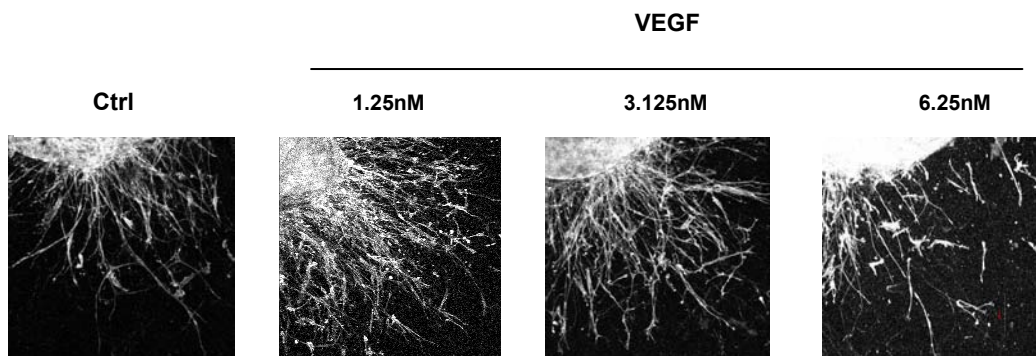
*6.3.1 Co-incubación de NGF y vasoinhibinas en explantes de DRGs.*- Los explantes fueron co-incubados con ya fuese 1nM, 5nM o 10nM de Vi y 3.125nM de NGF en 250µl de medio Neurobasal suplementado y mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, posterior a las cuales el procesamiento de las muestras y la técnica de inmunohistoquímica se llevaron a cabo mediante las técnicas previamente descritas.

## CAPÍTULO 7: RESULTADOS

### *7.1 Estudio piloto con revelado de Faloidina-Rodaminada.*

Con la intención de corroborar el efecto neurotrófico descrito en la literatura de la administración del VEGF en los explantes de los DRGs (Sondell et al., 1999), se realizaron ensayos de dosis-respuesta permitiendo la incubación de los explantes con concentraciones reportadas como neurotróficas del VEGF (Sondell et al., 2000), en distintos periodos de tiempo.

Como primera estrategia experimental, se realizó la incubación de los explantes con faloidina rodaminada. La faloidina es una toxina con afinidad por la actina fosforilada y al estar acoplada a un fluoróforo (rodamina) permite visualizar los filamentos de actina por microscopía de fluorescencia (Fig. 5).



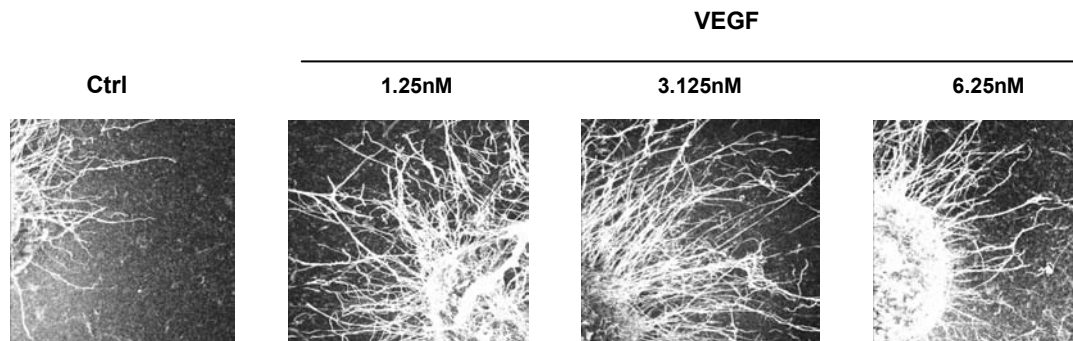
**Fig. 5** Imágenes de microscopía de fluorescencia de los efectos de distintas concentraciones de VEGF a 48 horas de incubación, utilizando Faloidina rodaminada para la visualización del crecimiento neurítico. Objetivo 10X

Dado que los ganglios de la raíz dorsal son un sistema con distintos tipos celulares (endoteliales, gliales, neuronales y de soporte), y considerando que se ha descrito que la administración de VEGF estimula la migración y/o la proliferación de éstos tipos

celulares (Silvermann et al., 1999), concluimos que aunque esta estrategia permitía una visualización de las ramificaciones de las células presentes en los DRGs, tal y como se puede apreciar en las imágenes, no es posible determinar con precisión si estos cambios ocurren específicamente en neuronas y por lo tanto, si estamos hablando de crecimiento de neuritas.

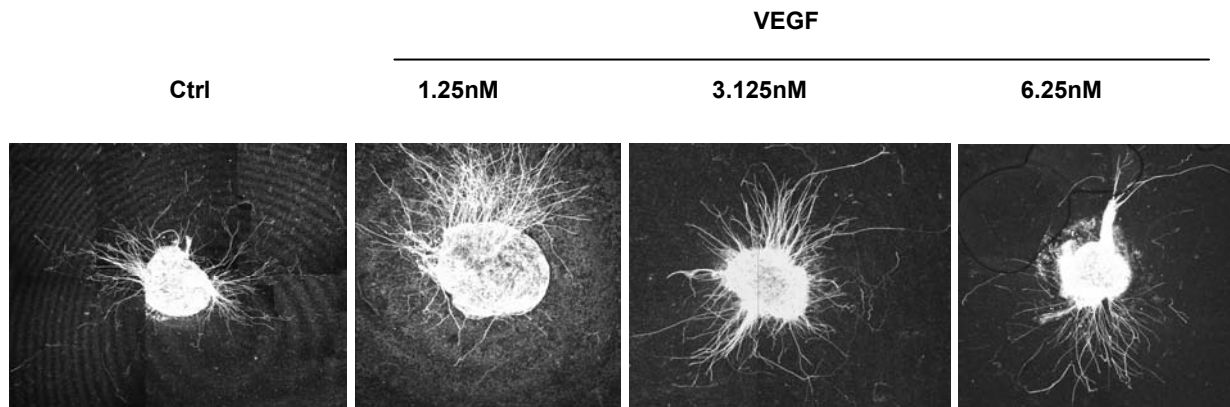
### **7.2 Determinación del efecto neurotrófico del VEGF en explantes de DRG.**

Para obtener información precisa sobre el efecto del VEGF en el crecimiento de las neuritas, se decidió realizar ensayos de inmunohistoquímica empleando un anticuerpo específico para la tubulina neuronal. Esta estrategia permitió la visualización del crecimiento específico de neuritas (Fig. 6) y la posibilidad de la cuantificación del mismo para la determinación de la curva dosis respuesta (Fig. 9).



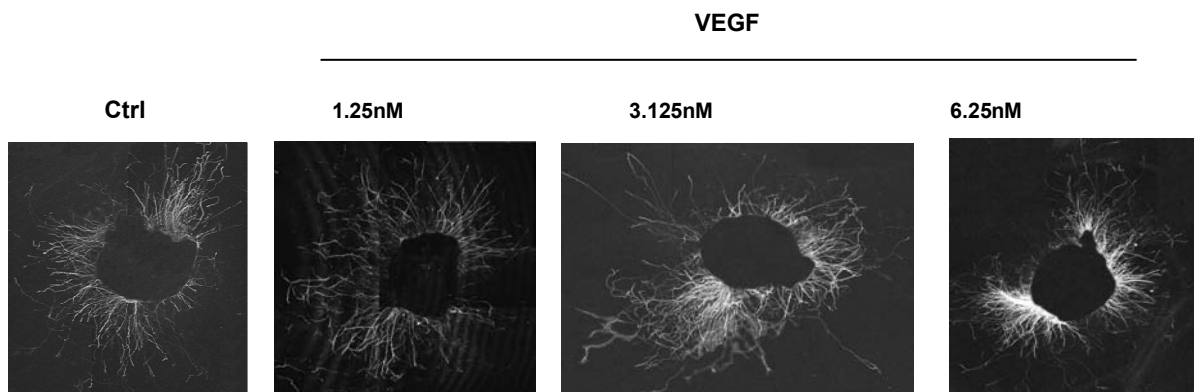
**Fig. 6** Imágenes de microscopía confocal de los efectos de distintas concentraciones del VEGF a 48 horas de incubación, utilizando anti  $\beta$ -Tubulina clase III neuronal para la visualización del crecimiento neurítico.

La serie de imágenes obtenidas por microscopía confocal permitieron el aplastamiento de imágenes para obtener a su vez imágenes en mosaico de los explantes completos (Fig. 7).

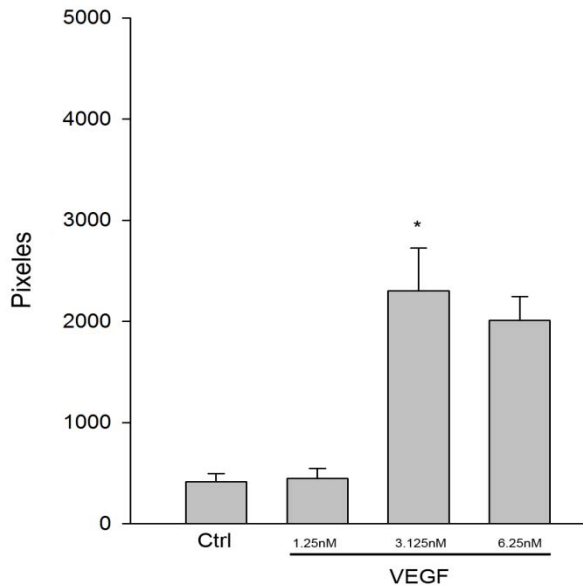


**Fig. 7** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs incubados durante 48 horas con distintas concentraciones del VEGF.

Dicha estrategia permitió el análisis indirecto del incremento en la densidad de las neuritas mediante el programa de Software Image pro plus. Dado que el programa reporta la cantidad de pixeles totales presentes en la imagen, y que el centro brillante de los DRGs aportaba ruido a las cifras que reportaba el software, se decidió oscurecer el centro de los DRGs con ayuda del programa de software Photoshop CS, tomando como rango de oscuridad el fondo de la misma imagen (Fig. 8). De esta manera se obtuvieron mediciones más objetivas de la densidad de las neuritas (Fig. 9).



**Fig. 8** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs incubados durante 48 horas con distintas concentraciones del VEGF en los cuales se ha oscurecido el centro.



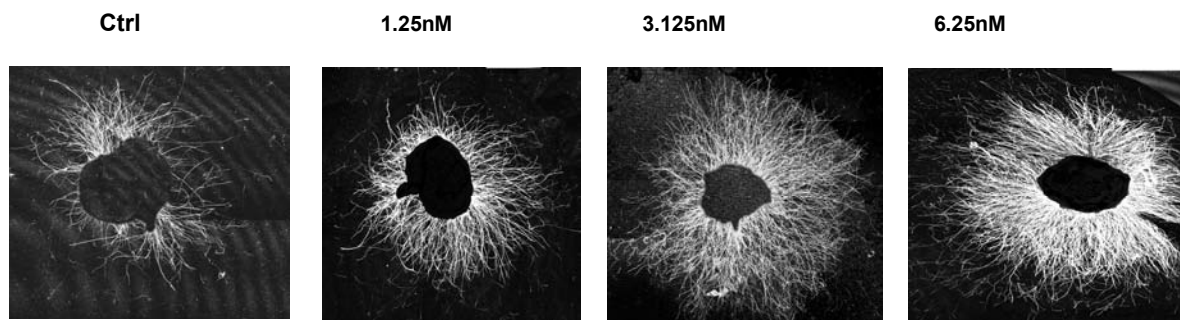
**Fig. 9** Efecto de la incubación con distintas concentraciones del VEGF durante 48 horas en relación a la densidad de neuritas. \*P<0.05 n=10 DRG

Mediante esta estrategia se determinó que la administración de 3.125nM de VEGF indujo un incremento en la densidad de las neuritas y que a mayor concentración se presenta un efecto en campana previamente descrito (sondell et al., 1999) y para el cual se ha hipotetizado que dada la cantidad de proteína que se encuentra en el medio de cultivo, éstas se unen a la porción extracelular de los monómero que componen a su receptor y no permiten la dimerización de los mismos, dando

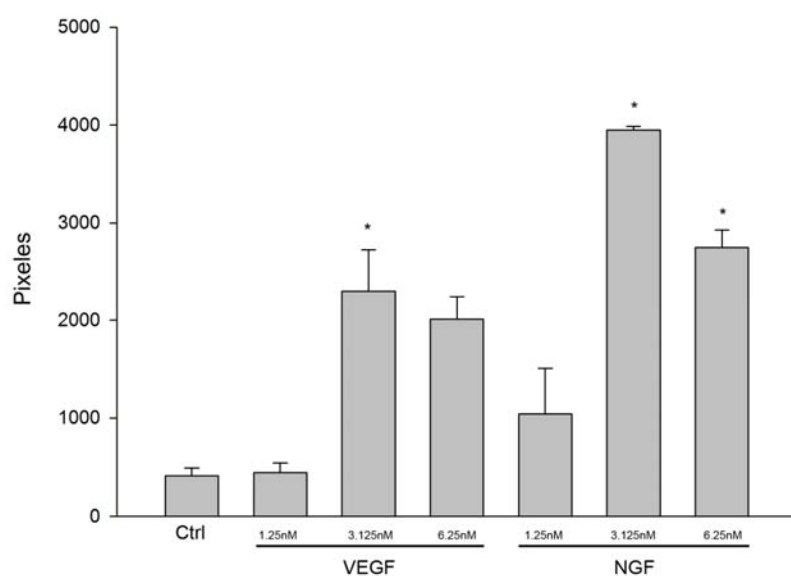
como resultado el impedimento para la fosforilación de las cadenas laterales de tirosina y la activación subsecuente de las distintas vías de señalización (MAPK, PI3K, Ras, Rho).

### **7.3 Determinación de efecto neurotrófico del NGF en explantes de DRG.**

Con el fin de analizar el efecto neurotrófico ampliamente descrito del NGF (Levi-Montalcini, 1987), se llevaron a cabo experimentos dosis-respuesta con distintas concentraciones del NGF en explantes de DRGs, utilizando para fines comparativos las mismas concentraciones usadas en los experimentos con el VEGF (1.25nM, 3.125nM y 6.25nM). Se observó que el incremento progresivo en las concentraciones de NGF induce un incremento igualmente progresivo en el crecimiento neurítico (Fig. 10 y 11).



**Fig. 10** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs incubados durante 48 hrs con distintas concentraciones de NGF en los cuales se ha oscurecido el centro.

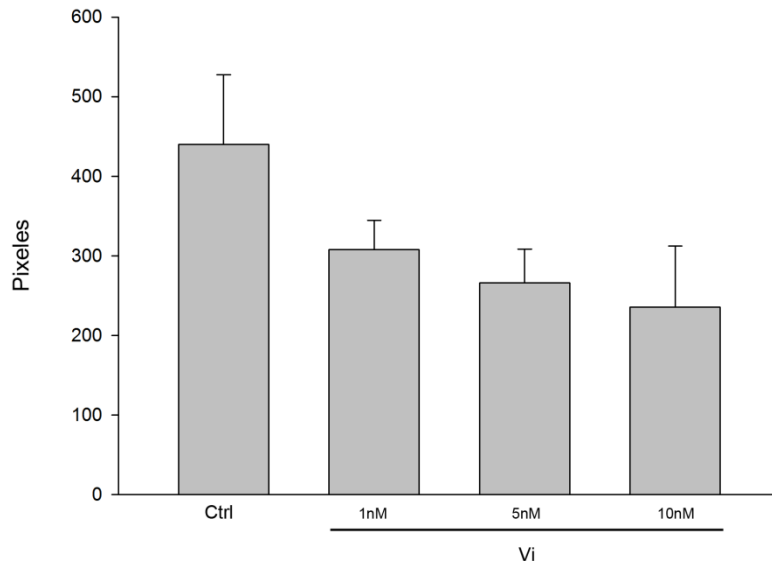


**Fig. 11** Comparativo del efecto de distintas concentraciones de VEGF y de NGF en relación a la densidad neurítica. \*P<0.05 n=10 DRG

El tratamiento con 3.125nM y 6.25nM del NGF indujo un incremento en la densidad de las neuritas en comparación con el grupo control, aunque no hubo una diferencia entre el crecimiento inducido por ambas concentraciones. Además, el incremento en la densidad de las neuritas fue mayor en todos los grupos de tratamiento en comparación con los grupos tratados con VEGF.

#### **7.4 Efecto de las Vasoinhibinas y del VEGF sobre las neuritas en explantes de DRG.**

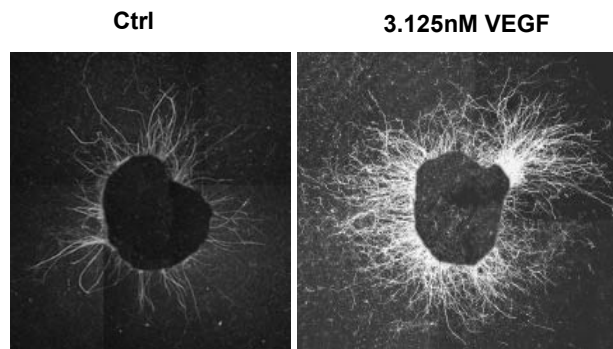
Para analizar los efectos de las Vasoinhibinas (Vi) sobre el crecimiento basal de neuritas en los explantes de DRGs, estos se incubaron con concentraciones crecientes



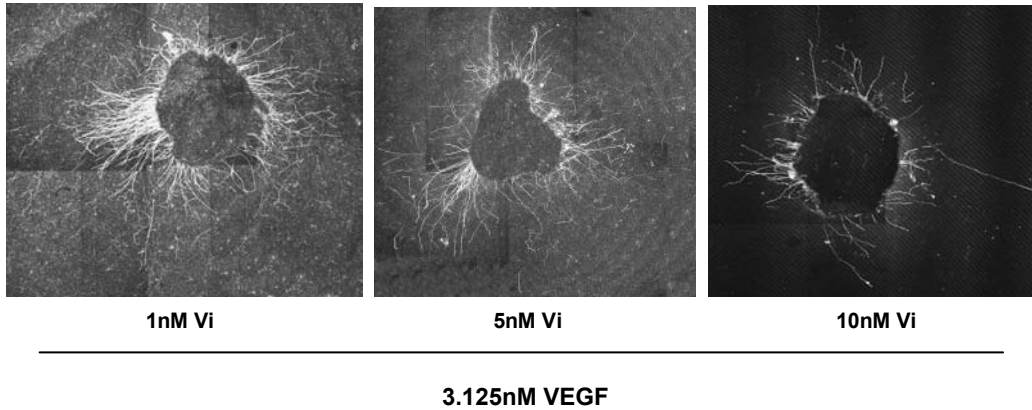
**Fig. 12** Comparativo del efecto de distintas concentraciones de Vi en relación a la densidad neurítica. n=10 DRG

significancia estadística en dicha disminución a ninguna de las concentraciones tratadas (Fig. 12).

Con el fin de determinar si los efectos previamente observados con el VEGF sobre las neuritas de los DRGs se modificaban al tratarlos con Vi, los DRGs se co-incubaron con VEGF (3.125nM) y 1, 5 ó 10nM de Vi durante 48 horas para su posterior fijación y tinción con anticuerpos para anti  $\beta$ -tubulina (Fig. 13).

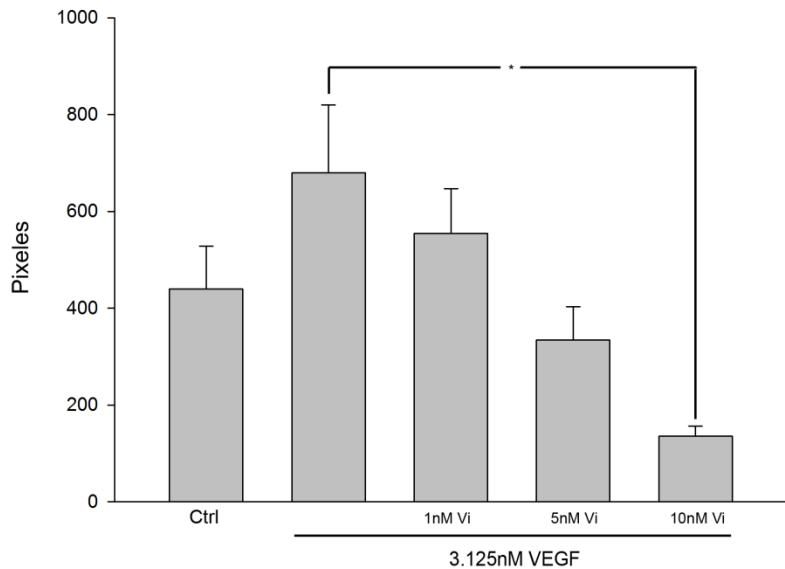


de Vi reportadas como inhibitoras de la proliferación en los experimentos de interacción entre dichas proteínas en el endotelio vascular (1, 5 y 10nM). El tratamiento con las vasoinhibinas mostró una tendencia a inducir una disminución en la densidad de neuritas, sin embargo no hubo



**Fig.13** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs co-incubados durante 48 horas con VEGF (3.125nM) y distintas concentraciones de Vaso-inhibinas (Vi) en los cuales se ha oscurecido el centro.

Las imágenes en mosaico de los explantes mostraron que el efecto neurotrófico inducido por el VEGF, tendía a la disminución conforme se incrementa la concentración de Vi utilizada durante la co-incubación, aun cuando el análisis de las imágenes mediante el número de pixeles reveló que sólo la co-incubación con 10nM de Vi inducía una disminución estadísticamente significativa de la densidad neurítica (Fig. 14).

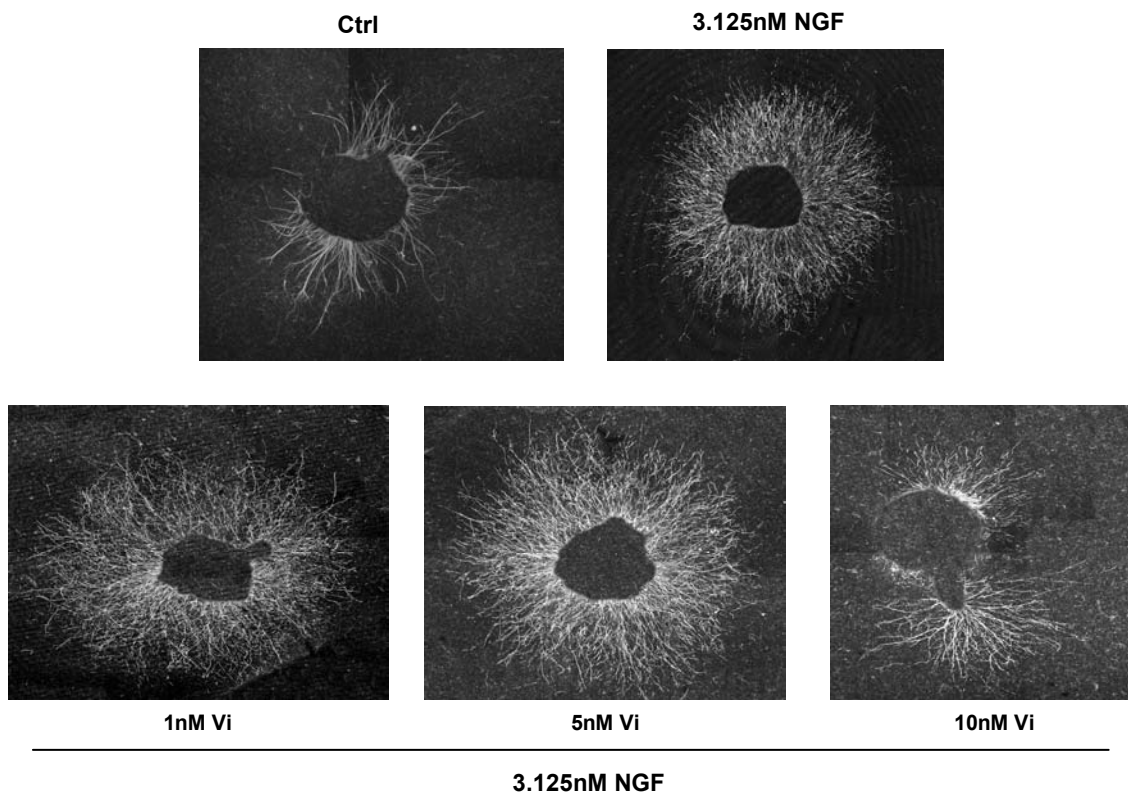


**Fig 14.** Efecto sobre la densidad neurítica de la administración de distintas concentraciones de Vi en DRGs co-incubados con VEGF \*P<0.05 n= 10 DRG.



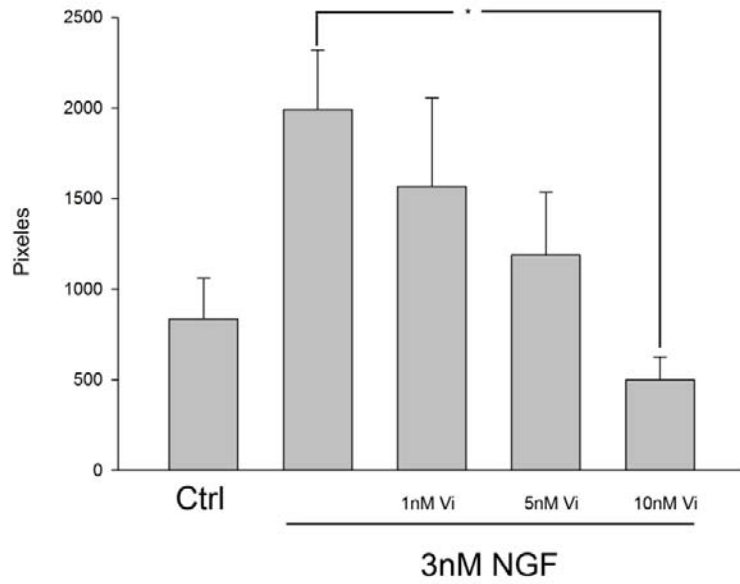
### **7.5 Efecto de las Vasoinhibinas y del NGF sobre las neuritas en explantes de DRG.**

Considerando los resultados obtenidos de la co-incubación del VEGF y las Vi sobre el crecimiento neurítico, y para determinar si la aparente inhibición que ejercen las Vi sobre las neuritas es privativa de la interacción con las cascadas de señalización activadas por VEGF, se realizaron experimentos de co-incubación entre 3.125nM del NGF y 1, 5 ó 10 nM de vasoinhibinas (Fig. 15).



**Fig.15** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs cultivados durante 48 horas co-incubados con NGF (3.125nM) y distintas concentraciones de vasoinhibinas.

La co-incubación de 3.125nM de NGF con 10nM de Vi indujo una disminución de la densidad neurítica. Sin embargo, el análisis cuantitativo mostró que la densidad de las neuritas presenta una tendencia a la disminución de manera dosis – dependiente (Fig. 16).



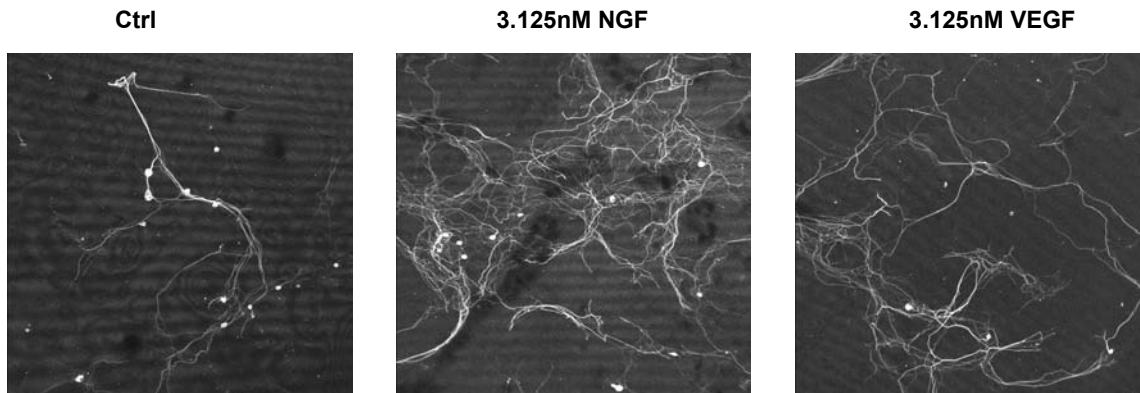
**Fig 16.** Efecto sobre la densidad de las neuritas de la administración de distintas concentraciones de Vi en DRG co-incubadas con NGF (3.125nM). \*P<0.05 n= 10 DRG.

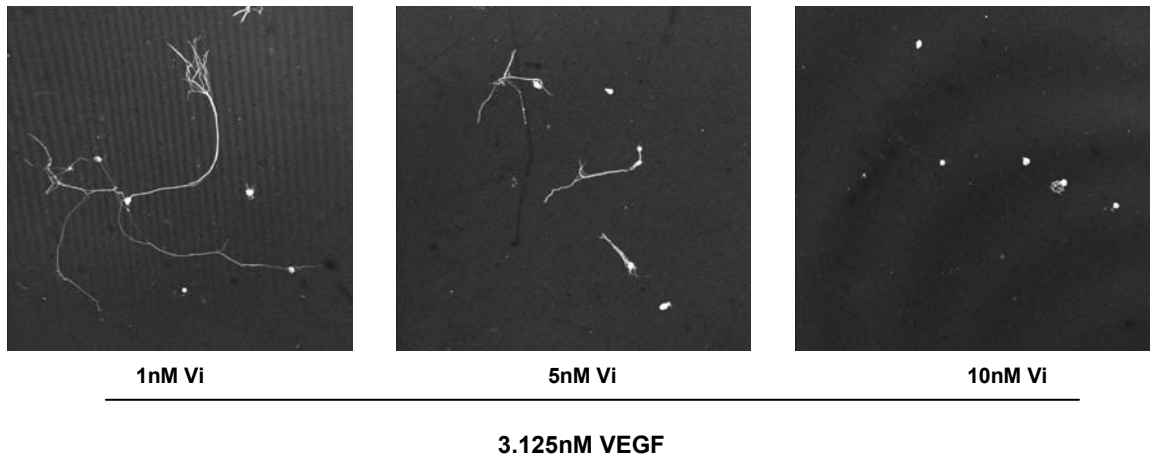
### 7.6 Efecto de las Vasoinhibinas y del VEGF sobre las neuritas en células disociadas de DRG.

Como ya se mencionó, los DRGs son un sistema que contiene, además de neuronas sensoriales, células endoteliales y mesenquimales. Por tal

motivo, el efecto que ejerce la administración del VEGF sobre el crecimiento de las

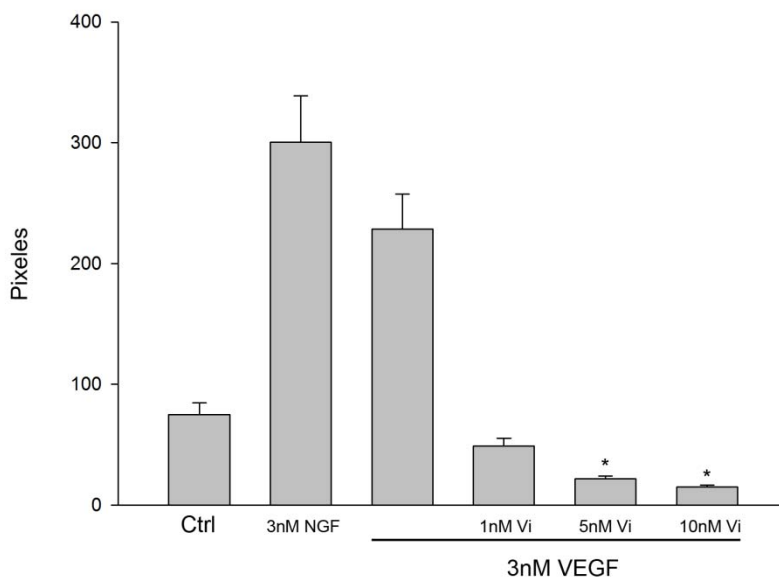
neuritas, podría estarse dando a través de las células endoteliales contenidas en el mismo. Una posibilidad es que las células endoteliales al ser estimuladas por el VEGF liberen otro factor neurotrófico que sea el cual lleve a cabo el efecto directo sobre las neuronas. Con la finalidad de estudiar el efecto directo del VEGF sobre las neuronas en los DRGs, se realizó la disociación de las células contenidas en los mismos para su posterior cultivo, tratamiento e inmunotinción (Fig. 17).





**Fig.17** Células disociadas de DRGs cultivadas durante 48 horas, co-incubadas con VEGF (3.125nM) y distintas concentraciones de vasoinhibinas.

Para corroborar la viabilidad de las células sometidas al proceso de disociación, se utilizó el NGF a una concentración de 3.125nM como control positivo. El NGF y el VEGF (3.125nM), incrementaron la densidad de las neuritas, en comparación al crecimiento observado en las células control (Fig. 18). Así mismo, cuando las células fueron co-incubadas con concentraciones crecientes de Vi, se observó una disminución en la densidad del crecimiento neurítico igualmente progresiva. La cuantificación de los pixeles demostró una disminución en la densidad neurítica de manera dosis-dependiente de las concentraciones de Vi empleadas.



**Fig.18** Efecto sobre la densidad neurítica de la administración de distintas concentraciones de Vi en células disociadas de DRGs co-incubadas con VEGF (3.125nM) durante 48 horas. \*P<0.05 VEGF vs Vi+VEGF n= 5.

## CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como ya se mencionó, el factor de crecimiento del endotelio vascular es una proteína ampliamente estudiada con conocidos efectos sobre la permeabilidad, migración y proliferación del endotelio vascular (Ferrara et al., 1992; Ferrara y Davis-Smyth, 1997), cuyos efectos sobre el sistema nervioso han sido recientemente descritos (Ruiz de Almodovar et al., 2009). Aunque los mecanismos a través de los cuales se llevan a cabo dichos efectos son aun poco conocidos, se han reportado ya algunas cascadas de señalización activadas a través de la unión del ligando a sus receptores, principalmente VEGFR1, VEGFR2 y NRP1 (Cheng et al., 2004; Prahst et al., 2008). Algunas de las cascadas descritas resultan ser vías compartidas con las cascadas de señalización activadas por el NGF y las cuales se han probado interrumpidas en su proceso de señalización por la administración de Vasoinhibinas en estudios de interacción de ambas proteínas en endotelio vascular (Clapp et al., 2006).

### ***8.1 Verificación del crecimiento neurítico inducido por la administración tanto del VEGF como del NGF en explantes de DRGs de ratas en período neonatal.***

Sondell y colaboradores realizaron los estudios pioneros del efecto neurotrófico del VEGF utilizando como modelo los ganglios de la raíz dorsal, determinando el crecimiento neurítico mediante la observación en contraste de fases de microscopio óptico (Sondell et al., 1999). Con dicho antecedente, la primera estrategia del presente proyecto fue la de reproducir los efectos ahí mostrados empleando para dicho propósito un revelado de Faloidina Rodaminada (Fig. 5). Dado que dicha toxina muestra afinidad por la actina fosforilada, este acercamiento nos permitió observar la estimulación tanto del crecimiento neurítico como de otros tipos celulares, efectos también descritos con antelación (Silvermann et al., 1999).

Aunque la estrategia con Faloidina rodaminada nos permitió observaciones valiosas, para cumplir los objetivos del presente estudio necesitábamos emplear una estrategia que nos permitiera la visualización únicamente del crecimiento neurítico. Por esta razón se decidió la utilización de un anticuerpo específico de la  $\beta$ -tubulina neuronal (Fig. 6).

Dado que la  $\beta$ -tubulina es una proteína esencial de los microtúbulos (principales componentes del citoesqueleto), el marcaje de dicha proteína nos permitió la observación del citoesqueleto de los DRGs en su totalidad, por lo que para poder analizar el crecimiento neurítico, se decidió el oscurecimiento del centro de los DRGs (Fig. 8). Como resultado de esta estrategia, se pudo determinar la estimulación del crecimiento neurítico inducido por la administración de VEGF y la curva dosis-respuesta con dicha proteína, la cual mostró el efecto en campana previamente reportado por otros grupos de investigación (Fig. 9) y cuya explicación podría ser que dada la cantidad de proteína que se encuentra en el medio de cultivo, éstas se unen a la porción extracelular de los monómeros que componen a su receptor y no permiten la dimerización de los mismos. Otra alternativa posible es la desesibilización de los receptores ante la abundancia del ligando.

Así mismo, los resultados obtenidos por la estimulación de distintas concentraciones del NGF en los explantes de los DRGs estuvieron acorde a la información existente en la literatura en relación al potente efecto neurotrófico del NGF. Nuestros resultados mostraron además que dicho efecto muestra una mayor potencia en relación al efecto neurotrófico obtenido con las distintas concentraciones de VEGF (Fig. 10 y Fig. 11)

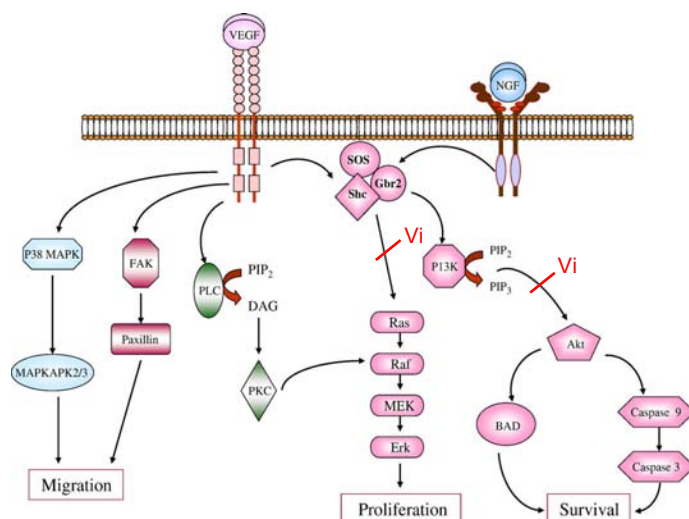
## ***8.2 Análisis del efecto sobre el crecimiento de neuritas de la co-incubación con distintas concentraciones de vasoinhibinas y VEGF en explantes de DRGs de ratas en período neonatal.***

Utilizando la dosis del VEGF que indujo un incremento en la densidad de neuritas como punto de comparación para los estudios ulteriores de interacción con vasoinhibinas, pudimos observar que la co-incubación con las distintas concentraciones de las mismas (1, 5 y 10nM) mostró una tendencia a la disminución en la densidad neurítica, que se alcanzó con la concentración de 10nM (Fig. 13 y Fig. 14). Dicho resultado nos mostró, por primera vez, la posible participación de las Vi en la remodelación del sistema nervioso periférico, la cual se podría estar dando de forma directa al bloquear las distintas cascadas de señalización activadas por la unión del

VEGF a los receptores VEGFR2 y NRP1, cuya expresión se ha descrito en las neuronas sensoriales contenidas en los DRGs (Sondell et al., 2004; Cheng et al., 2004; Kurcher et al., 2004). Otra posible explicación de estos resultados es que las Vi estuviesen bloqueando las cascadas de señalización que se activan al unirse el VEGF a sus receptores sobre las células endoteliales que se encuentran en los DRGs y que derivada de esta interacción, se promoviera una menor cantidad de células endoteliales, una menor perfusión y quizás una menor secreción de otros factores neurotróficos a partir de las mismas.

### 8.3 Análisis del efecto sobre el crecimiento de neuritas de la co-incubación con distintas concentraciones de vasoinhibinas y NGF en explantes de DRGs de ratas en período neonatal.

Al corroborar la disminución en el crecimiento de neuritas derivado de la co-incubación con distintas concentraciones de vasoinhibinas y VEGF, decidimos analizar el efecto de la co-incubación de las vasoinhibinas y el factor neurotrófico por excelencia, el NGF. De igual manera a lo sucedido con el VEGF, la co-incubación con vasoinhibinas dio como resultado una disminución en la densidad neurítica (Fig. 15 y Fig. 16). Estos resultados nos llevan a suponer que es a través del bloqueo en alguna de las vías de señalización compartidas por ambos factores de crecimiento (por ejemplo, MAPK) que las vasoinhibinas estarían ejerciendo su efecto antagónico, por lo menos en el contexto del sistema nervioso periférico (Fig. 19).



**Fig.19** Posible mecanismos de interacción entre las vías de señalización activadas por la unión de VEGF y NGF a sus respectivos receptores y las cuales pudieran ser antagonizadas por las vasoinhibinas. Modificado de Nico et al., 2008

#### ***8.4 Análisis del efecto sobre el crecimiento de neuritas de la co-incubación con distintas concentraciones de vasoinhibinas y VEGF en neuronas sensoriales de DRGs de ratas en período neonatal.***

Estudios previos con explantes tanto de SNC como de SNP mostraron que la administración del VEGF promueve la proliferación tanto de células endoteliales como de células de soporte (astrocitos y células de Schwann) y el crecimiento de neuritas. Esto sugiere la posibilidad de que las acciones del VEGF sobre las neuronas podrían estar ocurriendo de forma indirecta mediante factores adicionales que emanen de éstas mismas células sometidas a estimulación por el VEGF. Las propiedades neuroprotectoras del VEGF parecen ser una combinación de efectos neuroprotectores directos y la estimulación de la angiogénesis, la cual incrementa la perfusión sanguínea permitiendo un mayor aporte tanto de oxígeno como de nutrientes, los cuales tendrían un impacto neuroprotector indirecto.

Considerando lo anterior, se decidió la disociación de las células contenidas en los DRGs y el enriquecimiento de un cultivo de neuronas sensoriales para estudiar los efectos de la co-incubación con las vasoinhibinas. Los resultados obtenidos muestran que la densidad del crecimiento de las neuritas se vio disminuido de manera dosis dependiente por la interacción con las distintas concentraciones de vasoinhibinas (Fig. 17 y Fig. 18). Esto nos permite tener una mayor certeza, a nivel celular, de la existencia de efectos antagónicos de las vasoinhibinas sobre el sistema nervioso periférico.

## **CAPÍTULO 9: CONCLUSIONES**

- Las Vasoinhibinas antagonizan el crecimiento de neuritas inducido por la administración del VEGF y el NGF en explantes y en neuronas sensoriales de DRGs de ratas neonatales.
- Los mecanismos a través de los cuales se llevan a cabo dichos efectos tienen aun que ser dilucidados.



## CAPÍTULO 10: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aase K, von Euler G, Li X, Ponten A, Thoren P, Cao R, Cao Y, Olofsson B, Gebre-Medhin S, Pekny M, Alitalo K, Betsholtz C, Eriksson U (2001). Vascular endothelial growth factor-B deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 104: 358-364.

Achen M and Stacker S (1998). The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int. J. Exp. Path.* 79, 255-265.

Shafa M, Vakilian A, Poorebrahimi A and Kahnali J (2006). Serum prolactin level in multiple sclerosis patients. *JRMS* 11: 325-328.

Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappala G, Pafumi C and Bernardini R (2002). Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *FASEB J.* 16, 1307-1309.

Carmeliet P, Ferrerira 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: 435-439.

Cheng L, Jia H, Lörh M, Bagherzadeh A, Holmes D, Selwood D and Zachary I (2004). Anti-chemorepulsive effects of vascular endothelial growth factor and placental growth factor – 2 in dorsal root ganglion neurons are mediated via neuropilin – 1 and cyclooxygenase – derived prostanoid production. *J. Biol. Chem.* 279: 30654-30661.

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

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

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

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

Ferrara N and Davis-Smyth T (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18: 4-25.

Ferrara N, Houck K, Jakeman L and Leung D (1992). Molecular and Biological Properties of the Vascular Endothelial Growth Factor Family of Proteins. *Endocr. Rev.* 13: 18 – 32.

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

Galfione M, Luo W, Kim J, Hawke D, Kobayashi R, Clapp C, Yu-Lee L and Lin S (2003). Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expr. Purif.* 28: 252-258.

García C, Aranda J, Arnold E, Thébault S, Macotela Y, López – Casillas F, Mendoza V, Quiroz – Mercado H, Hernández – Montiel H, Lin S, de la Escalera M G 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: 2291-2300.

Grafman J (2000). Conceptualizing functional neuroplasticity. *J. Commun. Disord.* 33, 345 – 356.

Grafman J and Christen Y (1999). Neuronal Plasticity: Building a Bridge from the laboratory to the clinic. Research and Perspectives in Neurosciences. Paris: Foundation Ipsen Pour la Recherche Therapeutique.

Gregg C, Shikar V, Larsen P, Mak G, Chojnacki A, Wee V and Weiss S (2007). White Matter Plasticity and Enhanced Remyelination in the Maternal CNS. *J. Neurosci.* 27:1812-1823.

Haigh J, Morelli P, Gerhardt H, Haigh K, Tsien J, Damert A, Miquerol L, Muhlner U, Klein R, Ferrara N, Wagner E, Betsholtz C and Nagy A (2003). Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. *Dev. Biol.* 262: 225-241.

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T and Shibuya M (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 9349-9354.

Ilijin K, Karkkainen M, Lawrence E, Kimak M, Uutela M, Taipale J, Pajusola K, Alhonen L, Halmekyto M, Finegold D, Ferrell R, and Alitalo K (2001). VEGFR3 gene structure, regulatory region, and sequence polymorphisms. *FASEB J.* 15: 1028-1036.

Kurcher M, Klagsbrun M and Mamluk R (2004). VEGF is required for the maintenance of dorsal root ganglia blood vessels but not neurons during development. *FASEB J.* 18:1952-1954

Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A and Aloe L (2000). Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 1063-1069.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund S, Wyns S, Thijs V, Andersson J, Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Singh Pall H, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM and Carmeliet P (2003). *VEGF* is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.* 34: 383-394.

Lazarovici P, Marcinkiewicz C and Lelkes P (2006). Cross Talk between the cardiovascular and Nervous Systems: Neurotrophic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Angiogenic Effects of Nerve Growth Factor (NGF)- Implications in Drug Development. *Curr. Pharm. Des.* 12: 2609-2622.

Levi-Montalcini R (1987). The Nerve Growth Factor: thirty-five years later. *EMBO J.* 6:1145-1154.

Markianos M, Koutsis G, Evangelopoulos M, Mandellos D and Sfagos C (2010). Serum and Cerebrospinal Fluid Prolactin Levels in Male and Female Patients with Clinically-Isolated Syndrome or Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *J. Neuroendocrinol.* 22: 503-508.

Ming G and Song H (2005). Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 28: 223-250.

Nico B, Mangieri D, Benagiano V, Civellato E and Ribatti D (2008). Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc. Res.* 75: 135-141.

Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Dorpe JV, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeyer G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin D, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate K, Robberecht

W, Herbert JM, Collen D and Carmeliet P (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 28: 131-138.

Pimentel E (1994). Handbook of Growth Factors. Boca Raton: CRC Press.

Prahs C, Heroult M, Lanahan AA, Uziel N, Kessler O, Shraga-Heled N, Simons M, Neufeld G and Augustin HG (2008). Neuropilin -1 VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1. *J. Biol. Chem.* 283: 25110–25114.

Raab S and Plate K (2007). Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and nervous system. *Acta Neuropathol.* 113:607–626.

Rosenstein J and Krum J (2004). New roles for VEGF in nervous tissue – beyond blood vessels. *Exp. Neurol.* 187: 246 – 253.

Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M and Carmeliet P (2009). Roles and Therapeutic Potential of VEGF in the Nervous System. *Physiol. Rev.* 89: 607-648.

Schratzberger P, Schratzberger G, Silver M, Curry C, Kearney M, Magner M, Alroy J, Adelman L, Weinberg D, Ropper A and Isner J (2000). Favorable effects of vegf gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nature* 6: 405 – 413.

Silvermann F, Krum J, Mani N and Rosenstein J (1999). Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explants cultures. *Neuroscience* 90: 1529 – 1541.

Skaper S and Walsh F (1998). Neurotrophic Molecules: Strategies for Designing effective Therapeutic Molecules in Neurodegeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* 12: 179-193.

Soker S, Takashima S, Miao H Q, Neufeld G and Klagsbrun M (1998). Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform – Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. *Cell* 92: 735-745.

Sondell M., Lundborg G. and Kanje M (1999). Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 19: 5731 – 5740.

Sondell M, Sundler F, and Kanje M (2000). Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur. J. Neurosci.* 12: 4243-4254.

Taupin, P (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest. *Med. Sci. Monit.* 11: RA247-252.

Torner L, Mejía S, López – Gómez F, Quintanar A, Martínez G and Clapp C (1995). A 14 – Kilodalton Prolactin – Like Fragment Is Secreted by the Hypothalamo – Neurohypophyseal System of the Rat. *Endocrinology* 136: 5454 – 5460.

Vieira J, Schwarz Q and Ruhrberg C (2007). Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Development* 134, 1833-1843.

Wolpert L, Thomas J, Lawrence P, Meyerowitz E, Robertson E and Smith J (2007). Principles of development (pp. 149-180). España: Oxford University press.

Yang K and Cepko C L (1996). Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J. Neurosci.* 16:6089-6099.

Yang S, Zhang L, Huang Y and Sun F (2003). Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 274:851-856.

Zacchinga S, Lambrechts D, Carmeliet P (2008). Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9:169-181.

## Lista de Figuras

- Fig. 1.** Estructura de los genes que codifican para la expresión de distintos miembros de la familia del VEGF. p.7
- Fig. 2.** Distintas isoformas de VEGF-A generadas por splicing alternativo p.8
- Fig. 3.** Receptores de VEGF y sus respectivos ligandos p. 9
- Fig. 4.** Estructura molecular de la NRP1 con los sitios de unión para sus distintos ligandos p.10
- Fig. 5** Imágenes de microscopía de fluorescencia de los efectos de distintas concentraciones de VEGF a 48 horas de incubación utilizando Faloidina rodaminada para la visualización del crecimiento neurítico. p. 29
- Fig. 6** Imágenes de microscopía confocal de los efectos de distintas concentraciones de VEGF a 48 horas de incubación utilizando anti  $\beta$ -Tubulina Clase III neuronal para la visualización del crecimiento neurítico. p. 30
- Fig. 7** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs incubados durante 48 horas con distintas concentraciones del VEGF. p.31
- Fig. 8** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs incubados durante 48 horas con distintas concentraciones del VEGF en los cuales se ha oscurecido el centro. p.31
- Fig. 9** Efecto de la incubación con distintas concentraciones de VEGF durante 48 horas en relación a la densidad de neuritas. \*P<0.05 n=10 DRG p.32
- Fig. 10** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs incubados durante 48 horas con distintas concentraciones de NGF en los cuales se ha oscurecido el centro. p.33



**Fig. 11** Comparativo del efecto de distintas concentraciones de VEGF y de NGF en relación a la densidad neurítica. \*P<0.05 n=10 DRG p.33

**Fig.12** Comparativo del efecto de distintas concentraciones de Vi en relación a la densidad neurítica. n=10 DRG p.34

**Fig 13.** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs co-incubados durante 48 horas con VEGF (3.125nM) y distintas concentraciones de Vasoinhibinas (Vi) en los cuales se ha oscurecido el centro. p.35

**Fig 14.** Efecto sobre la densidad neurítica de la administración de distintas concentraciones de Vi en DRGs co-incubados con VEGF \*P<0.05 n= 10 DRG. p.35

**Fig.15** Imágenes en mosaico de explantes de DRGs cultivados durante 48 horas co-incubados con NGF (3.125nM) y distintas concentraciones de vasoinhibinas. p.36

**Fig.16** Efecto sobre la densidad de las neuritas de la administración de distintas concentraciones de Vi en DRGs co-incubadas con NGF (3.125nM). \*P<0.05 n= 10 DRG p.37

**Fig. 17** Células disociadas de DRGs cultivadas durante 48 horas, co-incubadas con VEGF (3.125nM) y distintas concentraciones de vasoinhibinas. p.38

**Fig. 18** Efecto sobre la densidad neurítica de la administración de distintas concentraciones de Vi en células disociadas de DRGs co-incubadas con VEGF (3.125nM) durante 48 horas. \*P<0.05 VEGF vs Vi+VEGF n= 5. p.39

**Fig. 19** Posible mecanismos de interacción entre las vías de señalización activadas por la unión de VEGF y NGF a sus respectivos receptores y las cuales pudieran ser antagonizadas por las vasoinhibinas. p.41