



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$ AL EFECTO
ANTIANGIOGÉNICO DE LA VASOINHIBINA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BRENDA LEDESMA MENDOZA

TUTORES:

DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.
DR. JUAN PABLO ROBLES ALVAREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DRA. CELINA GARCÍA MELENDEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.
MÉXICO, SEPTIEMBRE, 2022.



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: *Brenda Ledesma Mendoza*, cuyo título es: “*Análisis de la contribución de la integrina $\alpha 5\beta 1$ al efecto antiangiogénico de la vasoinhibina*” 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 Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente:

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Secretario:

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora

Vocal:

Dr. David Arredondo Zamarripa

Suplente:

Dra. Celina García Meléndrez

Suplente:

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Aprobado por el comité académico

Dra. Maricela Luna Muñoz

Coordinadora del programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jimenez L. Trabajo financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto CB-2017-2018-A1-S-9620-B-2937 y el otorgamiento de una beca al autor de este trabajo con CVU 1044382.

*A mis padres, mi gran fortaleza;
a mi hermana, la dulzura de mi vida;
a Charlie, mi cómplice de aventuras.*

A toda la gente que trabaja con amor y pasión.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al excelente apoyo técnico de Daniel Mondragón Huerta, Fernando López Barrera y Xarubet Ruiz Herrera.

A la asistencia y apoyo cotidiano de los integrantes de los laboratorios de Endocrinología molecular (A-14) y Neuroendocrinología de la reproducción (A-15) en el Instituto de Neurobiología de la UNAM.

A la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la UNAM a cargo del Dr. Manuel Torres Labansat.

Al Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) de la UNAM a cargo de la Dra. Maricela Luna Muñoz y a toda la gente que lo hace posible en los distintos departamentos y áreas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo en el proyecto CB-2017-2018-A1-S-9620-B-2937 y por la beca otorgada al autor de este trabajo con CVU 1044382.

A la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología de la UNAM, a cargo de la Dra. Nuri Aranda López.

A la Unidad de Videoconferencia del Instituto de Neurobiología de la UNAM, a cargo del Mtro. Moises Mendoza Baltazar y especialmente a la Lic. María de Lourdes Lara Ayala, QEPD.

A la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM a cargo de la M. en C. Adriana González Gallardo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, porque son mi mayor fortaleza y ejemplo de superación, además de haberme enseñado el valor del esfuerzo y el trabajo. Son la definición de apoyo y amor incondicional; este logro también es de ustedes, gracias infinitas.

A mi hermana, porque su dulzura y alegría día con día me dieron la energía para sobrellevar las adversidades. Para mí eres ejemplo de cariño sincero y paciencia. Gracias por enseñarme tanto y cuidar de mí.

A mi novio, Charlie, por siempre escuchar, alentar, acompañar y apoyar cada paso en este difícil trayecto. Gracias por tus constantes consejos y por inspirarme con tu entusiasmo, tu naturalidad y tu valentía, pero sobre todo tu inigualable amor.

A mis amigos, por siempre estar ahí presentes en pensamiento y cariño sincero. Gracias por su afecto, alegría y constante apoyo, sobre todo por siempre creer en mí. Especialmente a Majo, Albo, Miguel, Ferrus, Vivi, Jaz, América, Rosa y Edwin.

A Jaz y Edwin, son constante inspiración y refugio para mí, tienen toda mi admiración. Gracias por su sinceridad y su cariño inigualable.

A la Dra. Clapp por abrirme las puertas de su gran laboratorio, es una inspiración para mí como la gran mujer de ciencia que es.

A Juan Pablo Robles por brindarme la oportunidad de participar en este gran proyecto y a Magdalena Zamora y Lorena Gómez por compartirme su conocimiento y su tiempo.

A mis compañeros en el laboratorio, especialmente y con cariño a Jose, Gina, Fernando, Frei, Miri, Fer Macías y Elva, significó el mundo para mí su calidez y apoyo.

A Alexandra Elbakyan, por luchar por la libertad en el acceso al conocimiento.

ÍNDICE

Índice.....	i
Índice de figuras.....	iii
I. Resumen.....	iv
II. Abstract.....	v
III. Tabla de abreviaturas.....	vi
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 La angiogénesis.....	2
2.2 El eje PRL/Vasoinhibina.....	3
2.3 Inhibición de la función vascular por la vasoinhibina.....	5
2.4 Mecanismo molecular de la vasoinhibina.....	6
2.5 Posible receptor de la vasoinhibina.....	9
2.6 Las integrinas.....	10
2.7 La integrina $\alpha 5\beta 1$ y la angiogénesis.....	13
2.8 Interacción de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con factores angiogénicos.....	14
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.....	17
5.1 General.....	17
5.2 Particulares.....	17
6. Metodología.....	17
6.1 Ensayo de proliferación de las HUVEC.....	17
6.2 Inmunoneutralización de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en HUVEC.....	18
6.3 Cuantificación de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en HUVEC en respuesta a vasoinhibina, VEGF y bFGF.....	19
6.3.1 qRT-PCR.....	19
6.3.2 Inmunodetección por Western blot.....	20
7. Resultados.....	20

7.1	La vasoinhibina inhibe la proliferación de las HUVEC inducida con VEGF y bFGF.....	20
7.2	Anticuerpos específicos contra la integrina $\alpha 5\beta 1$ bloquean la acción inhibitoria de la vasoinhibina sobre la proliferación de HUVEC.....	21
7.3	La vasoinhibina eleva la expresión del ARN mensajero (ARNm) de las subunidades de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en HUVEC.....	23
7.4	Análisis del efecto de la vasoinhibina sobre la concentración de las proteínas $\alpha 5$ y $\beta 1$ en HUVEC.....	24
8.	Discusión.....	25
9.	Conclusión.....	35
10.	Bibliografía.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Producción de vasoinhibina a partir de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL).....	4
2. Mecanismo propuesto para el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la activación de la vía de la MAPK inducida por VEGF.....	7
3. Vías de señalización activadas por la vasoinhibina en células endoteliales.....	9
4. Mecanismos de transducción de señales mediados por integrina.....	12
5. Integración de la señalización consecuente a la estimulación de células endoteliales con VEGF.....	15
6. Acción inhibitoria de la vasoinhibina sobre la proliferación de las HUVEC inducida por VEGF y bFGF.....	21
7. Efecto de la inmunoneutralización de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre la acción inhibitoria de la vasoinhibina en la proliferación de HUVEC.....	22
8. Efecto de la vasoinhibina sobre los niveles del ARNm de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ en HUVEC.....	23
9. Evaluación por Western blot de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ en HUVEC.....	24
10. Interacción entre la integrina $\alpha 5\beta 1$ y receptores de factores de crecimiento (VEGFR y bFGFR).....	29
11. Conformación de las integrinas.....	30
12. Formación de un complejo multiproteico inducido por la señalización del VEGF en la membrana de células endoteliales.....	31
13. Modelo propuesto de la señalización de la vasoinhibina a través de la integrina $\alpha 5\beta 1$	34

I. RESUMEN

La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos, está regulada por el equilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos. La vasoinhibina es un inhibidor endógeno de la angiogénesis que resulta del procesamiento proteolítico de la hormona prolactina (PRL). La vasoinhibina inhibe la angiogénesis a través de bloquear la migración, proliferación y supervivencia de células endoteliales estimulada por factores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF). Las integrinas, proteínas transmembranales heterodiméricas responsables de la adhesión celular a la matriz extracelular (ECM), participan en el proceso angiogénico y se conoce que la integrina $\alpha 5 \beta 1$ media el efecto proapoptótico de la vasoinhibina en las células endoteliales. En este trabajo, se estudió si el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la proliferación de células endoteliales involucra a la integrina $\alpha 5 \beta 1$. Células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) se cultivaron y su proliferación se evaluó a través de medir la incorporación al ADN de un análogo de la timidina (EDU) mediante una reacción fluorescente. Consistentemente a lo esperado, encontramos que la vasoinhibina inhibe la estimulación de la proliferación de las HUVEC inducida por el tratamiento combinado de VEGF y bFGF y que dicho efecto se bloquea en presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la integrina $\alpha 5 \beta 1$ y contra las subunidades independientes $\alpha 5$ y $\beta 1$ de dicha integrina. También encontramos que la vasoinhibina elevó la expresión del ARNm de ambas subunidades ($\alpha 5$ y $\beta 1$) evaluada con qRT-PCR. Sin embargo, el análisis por Western blot no mostró el aumento de ambas proteínas. Estos resultados sugieren que la integrina $\alpha 5 \beta 1$ forma parte del mecanismo molecular por el cual la vasoinhibina inhibe la proliferación de células endoteliales. Estudios posteriores deberán analizar el mecanismo mediante el cual la interacción de la vasoinhibina con la integrina $\alpha 5 \beta 1$ interfiere con la proliferación endotelial.

II. ABSTRACT

Angiogenesis, the formation of new blood vessels, is regulated by the balance between proangiogenic and antiangiogenic factors. Vasoinhibin is an endogenous inhibitor of angiogenesis resulting from the proteolytic processing of the hormone prolactin (PRL). Vasoinhibin inhibits angiogenesis by blocking the endothelial cell migration, proliferation and survival stimulated by proangiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). Integrins, heterodimeric transmembrane proteins responsible for cell adhesion to the extracellular matrix (ECM), contribute to the angiogenesis process and the $\alpha 5\beta 1$ integrin mediates the proapoptotic effect of vasoinhibin on endothelial cells. In this work, we studied whether the inhibitory effect of vasoinhibin on the proliferation of endothelial cells involves the integrin $\alpha 5\beta 1$. We measured the proliferation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in culture by measuring the DNA incorporation of a thymidine analog (EDU) through a fluorescent reaction. As expected, vasoinhibin inhibited the stimulation of HUVEC proliferation induced by the combination of VEGF and bFGF. Furthermore, the inhibitory effect of vasoinhibin was prevented by monoclonal antibodies directed against the $\alpha 5\beta 1$ integrin and against the $\alpha 5$ and $\beta 1$ independent subunits of this integrin. Vasoinhibin elevated also the mRNA expression of both integrin subunits ($\alpha 5$ and $\beta 1$) as revealed by qRT-PCR. However, Western blot analysis showed no increase in the levels of the respective proteins to suggest that the upregulation of integrin $\alpha 5\beta 1$ production is not a contributing factor to vasoinhibin signaling. Altogether, we conclude that the $\alpha 5\beta 1$ integrin is part of the molecular mechanism by which vasoinhibin inhibits endothelial cell proliferation. Further studies are needed to analyze the mechanism by which the interaction of vasoinhibin with the $\alpha 5\beta 1$ integrin interferes with endothelial cell proliferation.

III. TABLA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
BBCE	Células endoteliales capilares de cerebro bovino
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
bFGFR	Receptor del factor básico de crecimiento de fibroblastos
BMP-1	Proteína morfogénica de hueso
CaM	Calmodulina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
ECGS	Suplemento del crecimiento celular endotelial
ECM	Matriz extracelular
EdU	5-Etini-2'-deoxiuridina
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
ERK	Proteína cinasa activada por mitógeno
FAK	Proteína cinasa de adhesiones focales
Flk-1	Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular
GDP	Guanosina difosfato
Grb2	Proteína 2 unida al receptor de factor de crecimiento
GTP	Guanosina trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HUVEC	Células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano
IL-1 β	Interleucina 1 β
IP3	Inositol trifosfato
LRP	Lipoproteína de baja densidad
MAPK	Proteínas cinasas de serina activadas por mitógenos
MEK	Proteína cinasa cinasa activada por mitógeno
MMP	Metaloproteasa de matriz
NF κ B	Factor nuclear kappa B
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1

Pak1	Proteína efectora de Ras cinasa 1 activadora de p21
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKB	Proteína cinasa B
PLC γ	Fosfoinosítido fosfolipasa C gamma 1
PRL	Prolactina
pro-uPA	Pro-urocinasa
RAEC	Células endoteliales aórticas de rata
Raf	Cinasa “rapidly accelerated fibrosarcoma”
Ras	Guanosina GTPasa pequeña
Ras-GAP	Ras-guanosina trifosfatasa
Ras-GAP	Ras-guanosina difosfatasa
RTKs	Receptores tirosinas cinasas
SFB	Suero fetal bovino
Shc	Proteína transformadora Shc
Sos	Proteína “son of sevenless”
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
Tiam-1	Proteína 1 inductora de invasión y metástasis de linfoma de células T
TKIs	Inhibidores de receptores tirosina cinasa
uPA	Activador de plasminógeno de tipo urocinasa
uPAR	Receptor del activador de plasminógeno de tipo urocinasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR1-s	Receptor tipo 1 del factor de crecimiento endotelial vascular soluble
VEGFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
Vi	Vasoinhibina
κ B α	Inhibidor de NF κ B

1. INTRODUCCIÓN

La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura preexistente (angiogénesis) ocurre durante el desarrollo embrionario y disminuye en el adulto como resultado de una estricta regulación cuya alteración deriva en distintas patologías (Chung y Ferrara, 2011). En esta regulación participan inhibidores endógenos, muchos de ellos generados a través de la proteólisis de proteínas que no poseen efectos sobre la angiogénesis (Nyberg *et al.*, 2005). Tal es el caso de la vasoinhibina, una familia de péptidos antiangiogénicos derivados de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL) que por sí misma es inactiva para inhibir la angiogénesis (Clapp *et al.*, 2006).

La PRL es secretada desde la hipófisis a la circulación general y también es producida en sitios extra hipofisarios como la córnea, retina, glándula mamaria, cartílago, corazón, etc; en cualquiera de estas circunstancias puede ser procesada a vasoinhibina (Clapp *et al.*, 2009; Cruz-Soto *et al.*, 2009; Torner *et al.*, 2003). La vasoinhibina participa en mantener restringida la vascularización y la alteración de su producción deriva en padecimientos que incluyen a las retinopatías, pre-eclampsia y cardiomiopatía del postparto (Clapp *et al.*, 2009).

La vasoinhibina lleva a cabo sus efectos antiangiogénicos mediante la inhibición de la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales, además de inhibir la vasodilatación y vasopermeabilidad. Dichos efectos tienen lugar a través del bloqueo de las vías de señalización de factores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), la interleucina 1 β (IL-1 β) y la bradicinina (Clapp *et al.*, 2006; Clapp *et al.*, 2015). Si bien los mecanismos moleculares del efecto antiangiogénico de la vasoinhibina han sido ampliamente abordados, la identidad de su receptor putativo es aún desconocida. Se sabe que la vasoinhibina lleva a cabo sus efectos mediante su unión al complejo membranal formado por el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), el activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA) y su receptor (uPAR) (PAI-1/uPA/uPAR) (Bajou *et al.*, 2014). Sin embargo, no se ha demostrado la capacidad del complejo PAI-1/uPA/uPAR de señalizar directamente de manera transmembranal y, por ende, no es

claro cómo la unión de la vasoinhibina a dicho complejo se traduce en la inhibición de la señalización intracelular activada por factores proangiogénicos.

Recientemente se demostró que la vasoinhibina también se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$ y que el bloqueo de esta unión interfiere con su efecto proapoptótico sobre células endoteliales (Morohoshi *et al.*, 2018). Las integrinas son proteínas heterodiméricas que interaccionan entre sí y con proteínas de la matriz extracelular (ECM) que señalizan para regular la proliferación, supervivencia y migración celular (Silva *et al.*, 2008). En particular, la integrina $\alpha 5\beta 1$ incrementa su expresión durante la angiogénesis y su bloqueo reduce la neovascularización fisiológica y patológica, lo que la convierte en blanco terapéutico en enfermedades angiogénesis-dependientes (Kim *et al.*, 2000). También se ha reportado que la integrina $\alpha 5\beta 1$ puede asociarse al complejo PAI-1/uPA/uPAR para regular distintos procesos como la migración endotelial en respuesta al VEGF, la adhesión celular y el ensamblaje de fibronectina (Binder *et al.*, 2007; Chaurasia *et al.*, 2006; Tarui *et al.*, 2003). Estas evidencias sugieren que la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría mediar los efectos inhibitorios de la vasoinhibina sobre la angiogénesis. El objetivo de este trabajo fue evaluar esta posibilidad mediante el bloqueo con anticuerpos de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en cultivos de células endoteliales.

2. ANTECEDENTES

2.1 LA ANGIOGÉNESIS

Durante la angiogénesis, las células endoteliales migran, proliferan y se organizan en estructuras tubulares. En el desarrollo embrionario, este proceso es esencial para la organogénesis, pero en la vida adulta está restringida a la reparación de heridas y al remodelamiento de los tejidos que ocurre en eventos reproductivos. Lo anterior, refleja una regulación muy estricta de la angiogénesis controlada por un equilibrio variable entre factores estimuladores (proangiogénicos) e inhibitorios (antiangiogénicos). La angiogénesis se asocia a enfermedades como el cáncer, psoriasis, artritis, retinopatía diabética, obesidad, asma y aterosclerosis (Carmeliet, 2005). Es por ello, que los mecanismos inhibitorios de la angiogénesis son considerados una importante estrategia

terapéutica en el tratamiento de algunas de estas enfermedades como el cáncer y la degeneración macular asociada con la edad (Ferrara y Kerbel, 2005).

En las últimas décadas, se han descubierto un gran número de moléculas inhibitoras de la angiogénesis (Cao, 2001; Nyberg *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2015) y algunas de ellas han culminado en su aplicación clínica, como los anticuerpos monoclonales anti-VEGF (Apte *et al.*, 2019) y los inhibidores de receptores tirosina cinasa (TKIs) (Qin *et al.*, 2019). Sin embargo, estas moléculas presentan algunas desventajas clínicas como toxicidad y resistencia (Bergers y Hanahan, 2008; Xu *et al.*, 2019). En particular, los factores antiangiogénicos endógenos podrían evitar algunos de estos efectos negativos. Cabe notar, que muchos de los factores antiangiogénicos endógenos conocidos provienen de la proteólisis de proteínas de la ECM, factores de crecimiento, citocinas, proteínas circulantes y hormonas que no poseen efectos sobre la angiogénesis (Cao, 2001; Nyberg *et al.*, 2005). Por ejemplo, la hormona PRL adquiere propiedades antiangiogénicas a través de su conversión proteolítica a vasoinhibina.

2.2 EL EJE PRL/VASOINHIBINA

La PRL es una hormona sintetizada en la hipófisis anterior con efectos endocrinos y paracrinós, que regula una gama amplia de funciones fisiológicas como: reproducción, osmorregulación, crecimiento, función cerebral, metabolismo y respuesta inmunitaria (Bole-Feysot *et al.*, 1998). La PRL tiene una estructura tridimensional que consta de cuatro alfa hélices dispuestas en forma antiparalela y unidas por asas flexibles (Teilum *et al.*, 2005). El corte proteolítico del asa larga que conecta la tercera y cuarta alfa hélices confiere a la PRL propiedades antiangiogénicas por su conversión a vasoinhibina, una familia de fragmentos proteicos cuyo tamaño comprende los primeros 48 a 160 residuos de la PRL y masas moleculares entre los 5 y 18 kDa (Triebel *et al.*, 2015). Dicha proteólisis es generada a partir de proteasas como la catepsina D, metaloproteasas de matriz (MMP), la proteína morfogénica de hueso (BMP-1) (figura 1) y la trombina (Clapp *et al.*, 2006; Zamora *et al.*, 2021).

La regulación en la generación de la vasoinhibina comprende un eje que integra al hipotálamo, la hipófisis y los tejidos diana (Triebel *et al.*, 2015). La vasoinhibina se genera en la hipófisis anterior desde donde es secretada como hormona efectora y está bajo

control fisiológico de la producción total de PRL y la actividad de la catepsina D (Cruz-Soto *et al.*, 2009). A nivel de tejidos diana, la concentración de la vasoinhibina se regula tanto por la PRL circulante como la PRL local, además de la actividad de las proteasas específicas locales (Triebel *et al.*, 2015). Por ejemplo, en tejidos como la retina, la placenta y en células como los condrocitos, la generación de vasoinhibina está controlada por la actividad de las enzimas catepsina D, proteína morfogénica de hueso-1 (BMP-1) y metaloproteasas de matriz (MMPs), respectivamente, además de la concentración de PRL local (Arnold *et al.*, 2010; Macotella *et al.*, 2006; Perimenis *et al.*, 2014). Otros tejidos donde se ha reportado la presencia de vasoinhibina endógena incluyen el endotelio vascular humano (Corbacho *et al.*, 2000), fluidos corporales como el suero y plasma humano y de rata, líquido amniótico, orina y fluido subretinal humano (Clapp *et al.*, 2015; Duenas *et al.*, 2004; Triebel *et al.*, 2009; Zepeda-Romero *et al.*, 2017).

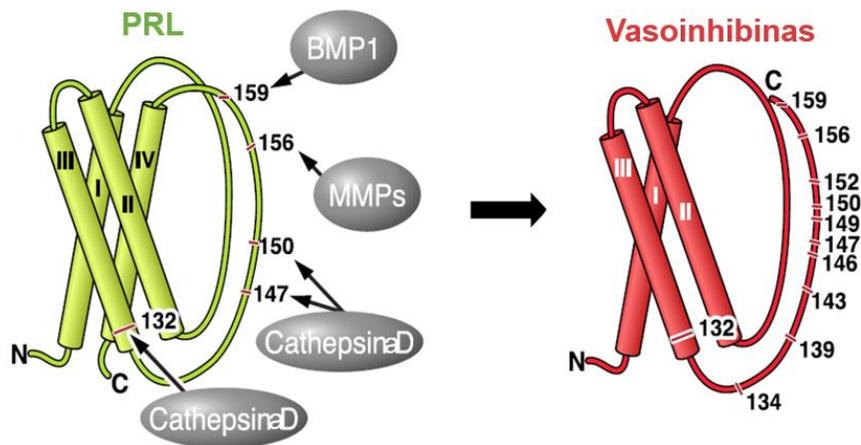


Figura 1. Producción de vasoinhibina a partir de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL). La proteína morfogénica de hueso tipo 1 (BMP1), las metaloproteasas (MMPs) y la catepsina D cortan a la PRL en el asa entre las hélices III y IV (izquierda). Las distintas isoformas de vasoinhibinas carecen de la alfa hélice IV y tienen una longitud variable (derecha) (Clapp *et al.*, 2009).

2.3 INHIBICIÓN DE LA FUNCIÓN VASCULAR POR LA VASOINHIBINA

La vasoINHIBINA inhibe la angiogénesis, vasodilatación y vasopermeabilidad (Clapp *et al.*, 2015; Triebel *et al.*, 2015). Su desregulación se ha relacionado a enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, la neurodegeneración, la preeclampsia y la cardiomiopatía del periparto (Clapp *et al.*, 2009; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007). Además, la vasoINHIBINA es el blanco terapéutico de dos estudios clínicos en edema macular diabético y cardiomiopatía del periparto, donde se evalúa la estimulación y reducción de su producción respectivamente (Triebel *et al.*, 2017).

Los efectos de la vasoINHIBINA en procesos de vascularización se han reportado en modelos *in vitro*; por ejemplo, la inhibición de la migración (Lee *et al.*, 2007) y la proliferación (Clapp *et al.*, 1993; Struman *et al.*, 1999) de células endoteliales de aorta de rata (RAEC) y de células endoteliales capilares de cerebro bovino (BBCE) respectivamente; y en modelos *in vivo*, como la inhibición en la vasculatura de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (Clapp *et al.*, 1993; Struman *et al.*, 1999) y la córnea de la rata (Duenas *et al.*, 1999).

La vasoINHIBINA también tiene importantes efectos en tejidos poco vascularizados como la retina o nada vascularizados como el cartílago. En el caso de la retina de ratas y humanos, la vasoINHIBINA se origina a partir de PRL sistémica o sintetizada localmente. El bloqueo de la vasoINHIBINA en la retina, ya sea con una inyección intravítrea de anticuerpos bloqueadores o con la transfección intraocular de ARN de interferencia a PRL, genera la estimulación de la angiogénesis y vasodilatación de este tejido (Clapp *et al.*, 2009). Por otro lado, durante el desarrollo embrionario la vasoINHIBINA endógena participa en el control de la remodelación vascular. Por ejemplo, en ratas neonatales estimula la regresión vascular mediada por apoptosis de los vasos hialoideos, un sistema intraocular de vasos sanguíneos que existe transitoriamente y que nutre los tejidos del ojo durante este período (Duenas *et al.*, 2004). Además, se reportó un desequilibrio en los niveles de PRL y vasoINHIBINA en pacientes con retinopatía del prematuro, lo que influye en la progresión de este padecimiento vasoproliferativo (Zepeda-Romero *et al.*, 2017). También se ha reportado que la vasoINHIBINA bloquea el aumento de la

vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas y en células endoteliales de capilares retinianos de rata y aórtica bovina estimuladas con VEGF (García *et al.*, 2008).

En el cartílago, la acción de factores antiangiogénicos permite que este tejido se mantenga avascular confiriendo elasticidad, flexibilidad y fuerza articular. Se sabe que este tejido es capaz de producir vasoinhibina, ya que la PRL es un componente del líquido sinovial, los condrocitos están enriquecidos en las MMP que convierten la PRL en vasoinhibina y se ha detectado a la vasoinhibina en extractos de condrocitos articulares. La PRL por su parte, promueve la supervivencia de los condrocitos articulares, lo que sugiere que tanto la PRL como la vasoinhibina actúan para mantener la integridad funcional del cartílago (Clapp *et al.*, 2009).

2.4 MECANISMO MOLECULAR DE LA VASOINHIBINA

La vasoinhibina inhibe las vías de señalización activadas por factores proangiogénicos como el VEGF, bFGF, IL-1 β y bradisinina, sobre distintos procesos celulares como la proliferación, migración y supervivencia endotelial, así como la formación de estructuras capilares (Clapp *et al.*, 2006, Clapp *et al.*, 2015). Tanto el VEGF como el bFGF promueven la proliferación endotelial a través de unirse a sus receptores tirosinas cinasas (RTKs) membranales y activar la vía de las proteínas cinasas de serina activadas por mitógenos (MAPK). Esta vía comprende la participación de proteínas adaptadoras (Shc, Grb2 y Sos) que al activar a Ras (una proteína G monomérica), resultan en la activación secuencial de tres proteínas cinasas de serina (Raf-1, MEK y MAPK). La participación de dichas proteínas cinasas de serina culmina en la translocación nuclear de MAPK y, por ende, en la fosforilación/activación de factores de transcripción de genes de respuesta temprana promotores de la proliferación celular (Ullrich y Schlessinger, 1990). D'Angelo y colaboradores (1999), describieron que la vasoinhibina bloquea la activación de las MAPK inducida tanto por VEGF como por bFGF mediante la inhibición de la activación de Ras. Este efecto involucra el impedimento de la disociación de Sos y Grb2 necesaria para la translocación de Sos a la membrana celular y su interacción con Ras. Además, la inactivación de Ras está regulada por la fosfatasa de Ras conocida como ras-guanosina trifosfatasa (GTPasa) (Ras-GAP) que estimula la desfosforilación de Ras unida a GTP (forma activa) a su estado inactivo unido

a GDP. Los autores demostraron que la vasoinhibina promueve la inactivación de Ras a través de estimular la actividad de la GTPasa de Ras. También, se propuso que la vasoinhibina aumenta los niveles de AMP cíclico que activan a la proteína cinasa A (PKA), la cual inhibe la traslocación de Raf-1 a la membrana interrumpiendo la activación de las cinasas subsecuentes (Figura 2) (D'Angelo *et al.*, 1999).

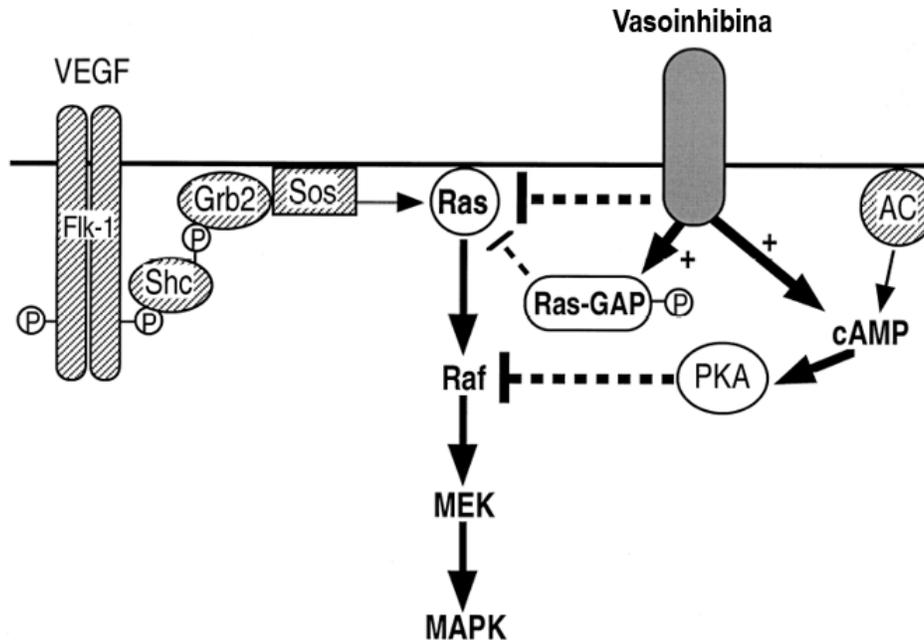


Figura 2. Mecanismo propuesto para el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la activación de la vía de la MAPK inducida por VEGF. VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; Flk-1, receptor 1 del VEGF; Shc, proteína transformadora Shc; Grb2, proteína 2 unida al receptor de factor de crecimiento; Sos, proteína “son of sevenless”; Ras, guanosina GTPasa pequeña; Raf, cinasa “rapidly accelerated fibrosarcoma”; MEK, proteína cinasa cinasa activada por mitógeno; MAPK, proteínas cinasas de serina activadas por mitógenos; Ras-GAP, Ras-guanosina difosfatasa; PKA, proteína cinasa A; cAMP, adenosín monofosfato cíclico; AC, Adenilato ciclasa (modificada de D'Angelo *et al.*; 1999).

Como resultado de la inhibición de la vía MAPK por vasoinhibina, se reducen los niveles de ciclina D1 y ciclina B1 al tiempo que se induce la expresión de reguladores negativos del ciclo celular, por ejemplo los inhibidores cinasa dependientes de ciclina p21(cip1) y p27(kip1) (Tabruyn *et al.*, 2005), con el consecuente arresto del ciclo celular tanto en la fase G0-G1 como en la fase G2-M.

Con respecto a la inhibición de la migración endotelial, la vasoinhibina actúa mediante el bloqueo del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA), el cual es un modulador esencial en el proceso de invasividad celular ya que convierte el plasminógeno inactivo en plasmina, una proteasa capaz de degradar la ECM y activar otras enzimas como MMP, colagenasas, etc. Lo cual es necesario para el desplazamiento de la célula durante la migración. El bloqueo de uPA se lleva a cabo mediante la estimulación en la expresión de su inhibidor, el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), el cual forma complejos PAI-1/uPA inactivos que disminuyen la actividad de uPA (Lee *et al.*, 1998) (Figura 3). Asimismo, la vasoinhibina inhibe la migración endotelial mediante el bloqueo en la activación de la GTPasa de Rho, Rac1; esto a partir de la supresión de la proteína 1 inductora de invasión y metástasis de linfoma de células T (Tiam-1) y su activador la proteína Ras, lo que resulta en la reducción de la fosforilación de la proteína efectora de Ras, la cinasa 1 activadora de p21 (Pak1), inhibiendo su traslocación a la zona activa de la migración celular (Lee *et al.*, 2007).

Otro efecto conocido de la vasoinhibina es la estimulación de la apoptosis endotelial que resulta de la activación de la vía del factor nuclear- κ B (NF κ B), un factor de transcripción que media la expresión de genes relacionados a respuestas celulares de inflamación, inmunidad, proliferación y apoptosis. La vasoinhibina induce la degradación del inhibidor de NF κ B (κ B α), lo que permite la traslocación de NF κ B al núcleo y la estimulación de la cascada apoptótica que involucra la activación de las caspasas-8 y 9, y la caspasa efectora-3, resultando en la fragmentación del ADN (Tabruyn *et al.*, 2003) (Figura 3).

Adicionalmente, se ha reportado que la vasoinhibina impide la vasodilatación y la vasopermeabilidad mediante el bloqueo en la movilización de calcio intracelular y el bloqueo en la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), inducida por

factores proangiogénicos como el VEGF y la bradicinina (García *et al.*, 2008; González *et al.*, 2004). Además, en varios modelos preclínicos se ha demostrado que la vasoinhibina reduce la progresión tumoral y la metástasis a través de su actividad antiangiogénica (Bentzien *et al.*, 2001; Kinet *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2007) (Figura 3).

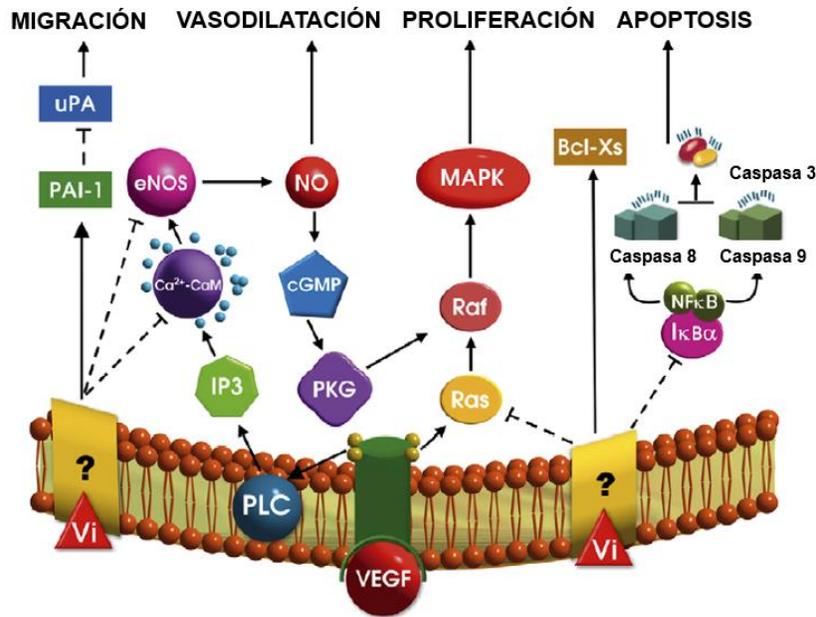


Figura 3. Vías de señalización de la vasoinhibina en células endoteliales. El receptor mediante el cual actúa la vasoinhibina es desconocido; sin embargo, se sabe que puede inhibir la migración mediante el aumento en la expresión de PAI-1, la vasodilatación y proliferación mediante el bloqueo de eNOS y la vía de las MAPK, y estimular la apoptosis mediante la activación de Bcl-XS y NFκB (Clapp *et al.*, 2006).

2.5 POSIBLE RECEPTOR DE LA VASOINHIBINA

Los receptores a través de los cuales la vasoinhibina lleva a cabo sus efectos aún se desconocen. Clapp y Weiner (1992) propusieron que la vasoinhibina actúa mediante un receptor diferente al receptor de PRL al mostrar sitios de unión de alta afinidad correspondientes a proteínas de 32 y 52 KDa de identidad desconocida en membranas de células endoteliales que interactúan con la vasoinhibina, mas no con la PRL. Más

recientemente, Bajou y colaboradores (2014) mostraron que los efectos antiangiogénicos de la vasoinhibina dependen de su unión al complejo membranal formado por PAI-1, uPA y su receptor uPAR (PAI-1/uPA/uPAR) en células endoteliales. Cuando este complejo no se forma, por ejemplo, en ratones *knockout* para el gen codificante de PAI-1 o con el silenciamiento génico de uPAR en células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC), la vasoinhibina pierde sus efectos sobre la neovascularización retiniana, crecimiento tumoral, migración endotelial y estimulación de la apoptosis endotelial. Sin embargo, el complejo PAI-1/uPA/uPAR es incapaz de señalar directamente de manera transmembranal ya que el receptor anclado a la membrana celular, uPAR, carece de dominios transmembranales y citosólicos. Por ende, no es claro cómo la unión de la vasoinhibina a dicho complejo se traduce en la inhibición de la señalización intracelular activada por factores proangiogénicos. Sin embargo, se conoce que uPAR puede funcionar como ligando de integrinas y que al interrumpir dicha interacción se interfiere con la migración celular (Kugler *et al.*, 2003). Más recientemente, se demostró que la vasoinhibina se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$ y que el bloqueo de esta unión interfiere con el efecto proapoptótico de la vasoinhibina sobre células endoteliales (Morohoshi *et al.*, 2018).

2.6 LAS INTEGRINAS

Las integrinas son una familia de glicoproteínas heterodiméricas transmembranales que median la adhesión célula-célula y célula-ECM. Se conforman por una subunidad α (18 tipos) y una β (8 tipos) compuestas por un gran dominio extracelular, una hélice transmembrana de un solo paso y un dominio citoplasmático corto; ambas subunidades interactúan de forma no covalente formando al menos 24 combinaciones únicas (Hynes, 2002). Los ligandos de integrina se unen a epítomos de una o ambas subunidades; estos son en su mayoría componentes de la ECM, sin embargo, las integrinas pueden acoplarse a otras moléculas que atraviesan la membrana como los receptores de factores de crecimiento, proteoglicanos y tetraspaninas, lo que influye en sus funciones (Kechagia *et al.*, 2019).

Muchos procesos celulares son dependientes de integrinas debido a que se ven inmersas en la dinámica del citoesqueleto, estructura celular y transducción de señales,

por lo que contribuyen en el mantenimiento de la polaridad, transporte, proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular y la integridad tisular (Kechagia *et al.*, 2019). Las integrinas retransmiten señales entre el medio extracelular y las vías intracelulares que ocurre en ambas direcciones, señalización *inside-out*, producida por interacciones moleculares originadas en el dominio citosólico; y señalización *outside-in*, generada a partir de la agrupación de las integrinas por estímulos extracelulares e interacciones con la ECM.

En células en reposo, las integrinas adoptan una conformación doblada (integrina inactiva) y a partir de interacciones bioquímicas y tensión mecánica, los dominios citoplásmicos de las subunidades α y β se separan (apertura) desencadenando un cambio conformacional en los dominios extracelulares a una forma desdoblada y extendida (integrina activa) que ofrece una mayor afinidad a sus ligandos (figura 11). La forma activa de la integrina permite su interacción con la ECM y con ello, la activación de proteínas efectoras en el dominio citoplásmico que favorecen su agrupación en complejos de adhesión que se traduce en señalización de diversas vías como la de la proteína cinasa de adhesiones focales (FAK), la de la tirosina cinasa Src, la proteína cinasa B (PKB), la proteína cinasa activada por mitógeno (ERK) y la regulación de pequeñas GTPasas de la familia Rho (Huveneers y Danen, 2009).

Los mecanismos por los cuales las integrinas transducen señales incluyen: (1) el acoplamiento con receptores de factores de crecimiento provocando la sinergia de vías de señalización paralelas; (2) la reorganización del citoesqueleto por agrupación de integrinas, generando adhesiones focales, hemidesmosomas o podosomas donde aumentan las señales de receptores de factores de crecimiento acercando cinasas y sustratos; (3) la formación de sitios de anclaje con el citoesqueleto mediante adhesiones célula-ECM, provocando tensión, cambios de forma a nivel citoplásmico y nuclear, afectando la expresión de genes; (4) la transactivación de RTKs, incluido el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del VEGF y miembros de la familia Src cinasas y (5) la reorganización de la ECM, modificando factores de crecimiento que regulan la señalización de sus RTKs (Figura 4) (Huveneers *et al.*, 2007).

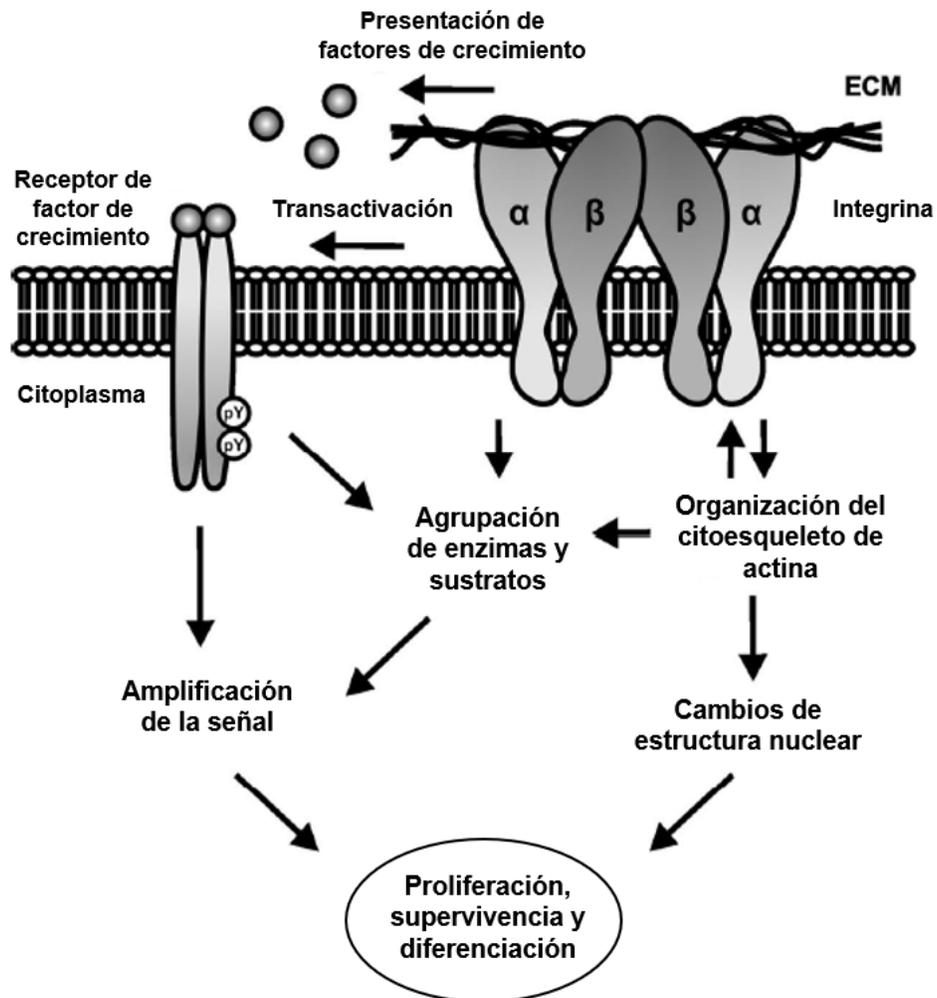


Figura 4. Mecanismos de transducción de señales mediados por integrinas. Las integrinas participan en una amplia gama de procesos celulares a través de distintos mecanismos: (1) transactivación y sinergia con receptores de factores de crecimiento; (2) agrupación de proteínas en las adherencias de la matriz celular; (3) anclaje del citoesqueleto de actina; (4) cambios en expresión génica por modificación de la morfología nuclear; y (5) organización de la ECM (Huveneers *et al.*, 2007).

2.7 LA INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$ Y LA ANGIOGÉNESIS

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ están presentes en células endoteliales y participan en su crecimiento, migración y supervivencia durante la angiogénesis (Avraamides *et al.*, 2008). En particular, la integrina $\alpha 5\beta 1$ cuyo ligando es la fibronectina, incrementa su expresión durante la angiogénesis y su bloqueo reduce la neovascularización fisiológica y patológica (Kim *et al.*, 2000). El papel crítico de la integrina $\alpha 5\beta 1$ se aprecia a través de la delección genética de la subunidad $\alpha 5$ que resulta en la muerte embrionaria temprana debido a extensos defectos vasculares asociados a una disminución en la expresión de fibronectina (Francis *et al.*, 2002). Además, teratocarcinomas desarrollados a partir de células embrionarias nulas para $\alpha 5$ muestran una menor proliferación, mayor apoptosis y menor vascularización en comparación con los desarrollados a expensas de células embrionarias silvestres (Taverna y Hynes, 2001). Por su parte, los embriones *knockout* para la subunidad $\beta 1$ también mueren temprano en la gestación (Fässler y Meyer, 1995); el teratoma $\beta 1$ nulo presenta un crecimiento limitado por desarrollar menos vasos sanguíneos; y los cuerpos embrioides nulos para $\beta 1$ carecen de una red vascular compleja y presentan resistencia a la proliferación y ramificación vascular en respuesta al VEGF (Bloch *et al.*, 1997). Además, antagonistas de la integrina $\alpha 5\beta 1$ inhiben la angiogénesis tumoral reduciendo el crecimiento del tumor y su regresión vascular (Kim *et al.*, 2000), la angiogénesis corneal (Muether *et al.*, 2007) y la angiogénesis coroidal en pollos y ratones (Umeda *et al.*, 2006).

Estudios *in vitro* han mostrado que se requiere de la adhesión de las células endoteliales a fibronectina (ligando natural de la integrina $\alpha 5\beta 1$), para que el bFGF estimule su proliferación, que se ha relacionado con la capacidad de la integrina $\alpha 5\beta 1$ para activar la GTPasa Rac1 que conlleva a la traducción de la ciclina D1 y, por ende, a la progresión a la fase S del ciclo celular (Mettouchi *et al.*, 2001). Además, la integrina $\alpha 5\beta 1$ activa el programa genético dependiente de NF- κ B que conduce a la inducción de la angiogénesis y al fenotipo endotelial inflamado (Klein *et al.*, 2002).

2.8 INTERACCIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 5\beta 1$ CON FACTORES ANGIOGÉNICOS

Además del bFGF, la integrina $\alpha 5\beta 1$ posee una amplia interacción con otros factores angiogénicos. Por ejemplo, las HUVEC se adhieren al receptor tipo 1 del factor de crecimiento endotelial vascular soluble (VEGFR1-s) presente en la ECM mediante la integrina $\alpha 5\beta 1$; esta unión restringe el efecto antiangiogénico propio del VEGFR1-s y además promueve un fenotipo móvil en las células necesario para la angiogénesis, ya que se impide la formación de adhesiones focales por el bloqueo en la activación de FAK (Orecchia *et al.*, 2014). Adicionalmente la integrina $\alpha 5\beta 1$ se une a la angiopoietina-2 y a su receptor (Tie-2) para la promoción de la angiogénesis (Felcht *et al.*, 2012).

Otra interacción importante de la integrina $\alpha 5\beta 1$ es con uPAR, una proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol en la superficie celular que forma parte del sistema de activación del plasminógeno involucrado en eventos de reorganización de tejidos como la reparación de heridas (Del Rosso, 2011). Debido a que uPAR carece de dominios transmembranales y citosólicos debe interactuar con otras moléculas para señalar en el desarrollo de procesos celulares. Estas moléculas incluyen receptores acoplados a proteínas G, receptores de factores de crecimiento y las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$ (Kugler *et al.*, 2003). La interacción de uPAR con la integrina $\alpha 5\beta 1$ regula la migración celular y el ensamblaje de la matriz de fibronectina (Chaurasia *et al.*, 2006; Tarui *et al.*, 2003).

Otro mecanismo es la inducción de la migración endotelial en respuesta al VEGF que se ha propuesto depende de la internalización del receptor 2 del VEGF (VEGFR2) que se favorece mediante su interacción con el complejo pro-urocinasa (pro-uPA)-uPAR vía la integrina $\alpha 5\beta 1$. La unión del VEGF a su receptor VEGFR2 induce su dimerización y fosforilación en tirosinas cinasas lo que resulta en la activación de varias enzimas proteolíticas. Una de ellas, la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K), la cual aumenta la afinidad de la integrina $\alpha 5\beta 1$ por el VEGFR2 y por uPAR lo que permite que la integrina $\alpha 5\beta 1$ funcione como molécula adaptadora para la formación del complejo VEGFR2- $\alpha 5\beta 1$ -uPAR. A su vez, uPAR recluta al receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP) que dispara la internalización de todo el complejo (VEGFR2/ $\alpha 5\beta 1$ /uPAR/LRP) que a su vez promueve la señalización citoplásmica del VEGF determinante de la migración celular (Herkenne *et al.*, 2015). En conjunto, la respuesta integrada de estas moléculas es

decisiva para la señalización del VEGFR2 inducida por VEGF y sus efectos angiogénicos, al igual que la redistribución de las proteínas involucradas (Figura 5) (Binder *et al.*, 2007; Herkenne *et al.*, 2015).

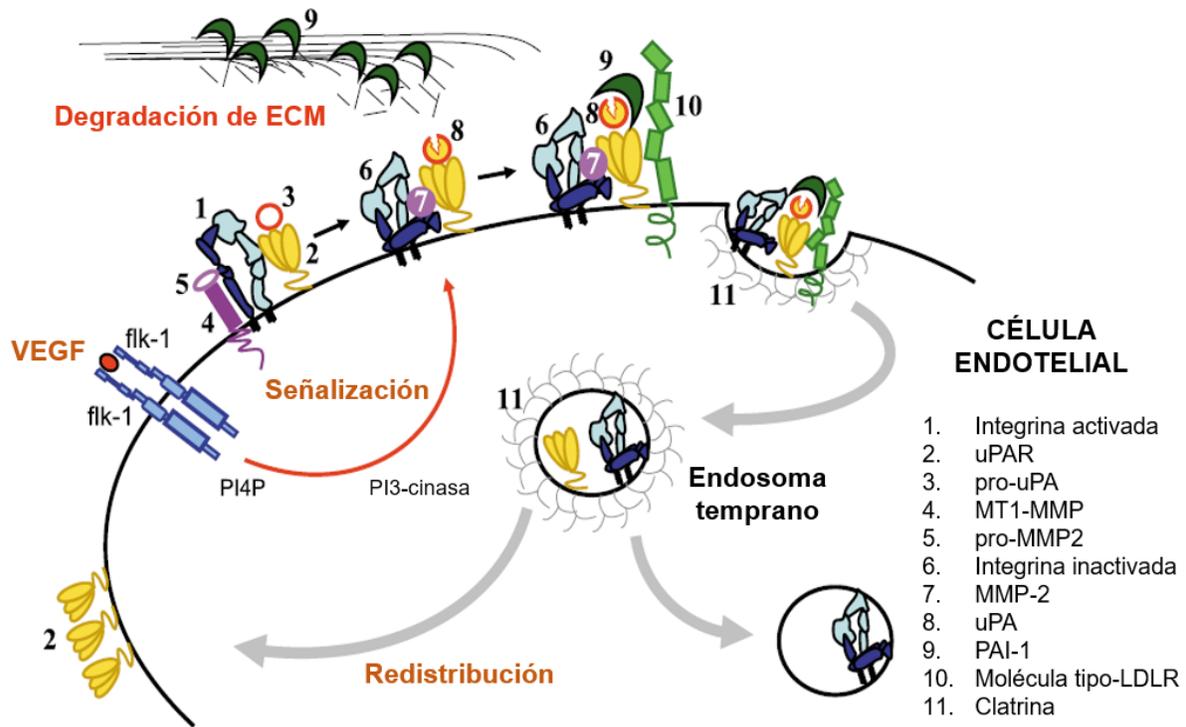


Figura 5. Integración de la señalización consecuente a la estimulación de células endoteliales con VEGF. En la membrana de células endoteliales se forma un complejo integrado por la proteína pro-uPA unida a su receptor uPAR y la integrina $\alpha 5\beta 1$; pro-uPA pasa a su forma madura uPA atrayendo al complejo a PAI-1 unido a la proteína LRP, con la cual el complejo se internaliza, señaliza y se redistribuyen uPAR y la integrina a las adherencias focales (Binder *et al.*, 2007).

Sin embargo, también se tienen evidencias que indican que las integrinas pueden mediar los efectos de factores antiangiogénicos. Uno de estos factores es la endostatina, el dominio C-terminal del colágeno tipo XVIII, que ejerce su actividad inhibitoria sobre la migración endotelial y la formación tubular a través de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Mettouchi y

Meneguzzi, 2006; Serini *et al.*, 2008). Se ha mostrado que anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ bloquean la acción antiangiogénica de la endostatina (Sudhakar *et al.*, 2003), pero se desconoce el mecanismo involucrado.

Recientemente, Morohoshi y colaboradores (2018) reportaron que la vasoinhibina se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$ y que dicha unión determina su efecto proapoptótico en células endoteliales. Mostraron que la interacción de la vasoinhibina con la integrina $\alpha 5\beta 1$ es mayor a la de dicha integrina por su sustrato natural, la fibronectina; que la vasoinhibina forma un complejo estable con la integrina $\alpha 5\beta 1$ que permite su inmunoprecipitación; y que anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra la integrina $\alpha 5\beta 1$ bloquean la acción proapoptótica de la vasoinhibina sobre HUVEC en cultivo. Estos hallazgos apoyan el supuesto de que la integrina $\alpha 5\beta 1$ media los efectos proapoptóticos de la vasoinhibina, pero no evalúan si dicha integrina también participa en los otros efectos antiangiogénicos de la vasoinhibina como lo es la inhibición de la proliferación endotelial. En este trabajo, analizamos la participación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en los efectos inhibitorios de la vasoinhibina sobre la proliferación de HUVEC a través de su inhibición con anticuerpos monoclonales neutralizantes.

3. JUSTIFICACIÓN

Se tiene poca información sobre el receptor que media la señalización de la vasoinhibina. Recientemente, se identificó el determinante funcional de la vasoinhibina, lo cual derivó en la generación de análogos peptídicos de tan solo 3 a 7 aminoácidos que conservan las propiedades antiangiogénicas de la vasoinhibina. Debido al gran potencial farmacéutico de estos análogos, se sometieron solicitudes de patente nacional (Patent No. Mexico: MX/E/2019/079075) e internacional (PCT Application No.: PCT/EP2020/069154. Mexico, European Union 2019/2020, Publication No. WO/2021/098996). La pronta traslación a la clínica de estos análogos depende, entre otros aspectos, del entendimiento del mecanismo de señalización molecular de la vasoinhibina.

El análisis de la posible participación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la mediación de los efectos antiproliferativos endoteliales de la vasoinhibina facilitará investigaciones futuras sobre su mecanismo antiangiogénico de señalización.

4. HIPÓTESIS

La integrina $\alpha 5\beta 1$ participa en el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar si la integrina $\alpha 5\beta 1$ participa en el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la proliferación de HUVEC.

5.2 Particulares

- 1) Evaluar el efecto de la vasoinhibina sobre la proliferación de las HUVEC inducida con VEGF y bFGF.
- 2) Analizar el efecto de anticuerpos monoclonales neutralizantes de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre la inhibición de la proliferación de las HUVEC en respuesta a la vasoinhibina.
- 3) Evaluar si la vasoinhibina regula la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (ARNm y proteína) en las HUVEC.

6. METODOLOGÍA

6.1 Ensayo de proliferación de las HUVEC

La proliferación de las HUVEC se evaluó mediante la incorporación del análogo de timidina, 5-Etínil-2'-deoxiuridina (EdU) (Sigma-Aldrich, cat. T511285) al ADN sintetizado durante la proliferación celular y su detección con azida fluorescente (Sigma-Aldrich, cat. 760757) mediante el método de click ("copper-catalyzed cycloaddition reaction") (Salic y Mitchison, 2008). Las HUVEC se aislaron (Baudin *et al.*, 2007) y se cultivaron en medio

F-12K (Gibco, cat. 21127-022) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, cat. 26140-079), 1% de penicilina-estreptomicina (Biowest, cat. L0022-100), 100 µg/mL de heparina (Sigma-Aldrich, cat. 60800-63-7) y 25 µg/mL del suplemento del crecimiento celular endotelial (ECGS) (Corning, cat. 356006) a 37°C. Para los experimentos de proliferación se sembraron 14,000 células/cm² en placas de 96 pozos y 24 h después las células se estacionaron con medio F-12K al 0.5% de SFB durante 12 h. Se establecieron cuatro condiciones experimentales: HUVEC sin inducción de proliferación con o sin vasoinhibina, y HUVEC con inducción de proliferación con o sin vasoinhibina. La proliferación celular se indujo añadiendo una combinación de 25 ng/mL de VEGF, 20 ng/mL de bFGF, 100 µg/mL de heparina en F-12K al 20% de SFB sin ECGS. Al mismo tiempo se trataron las células con 100 nM de vasoinhibina y 10 µM del análogo de timidina EdU. La vasoinhibina empleada fue la de 16 KDa y 123 aminoácidos; se produjo de manera recombinante como lo reportado anteriormente por Galfione y colaboradores (2003). A las 24 h del tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 min y se permeabilizaron con 0.5% de Tritón X-100 en TBS 1X por 1 h. Entre cada paso se realizaron lavados con TBS 1X por 2 min en agitación. El EdU presente en el ADN de las células se detectó mediante la tinción con la mezcla de reacción click (100 mM de Tris, 0.5 mM CuSO₄, 50 mM de ácido ascórbico y 30 µM de Azida de Fluor 545) durante 30 min seguido de un lavado de 50 min con 0.5 % Tritón X-100 en TBS 1X. Se realizó una cotinción del ADN nuclear con 5 µg/mL del reactivo Hoechst 33342 durante 20 min, este reactivo se une al surco menor del ADN destacando los núcleos celulares por lo que sirvió como referencia para cuantificar células totales. Las células se visualizaron y fotografiaron mediante un microscopio de fluorescencia bajo las longitudes de onda de 400 y 570 nm para la visualización de la tinción de Hoechst y EdU respectivamente. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software CellProfiler (Carpenter *et al.*, 2006) e Image J (Schneider *et al.*, 2012).

6.2 Inmunoneutralización de la integrina α5β1 en HUVEC

Para inmunoneutralizar a la integrina α5β1, se agregaron anticuerpos específicos de la integrina α5β1 pertenecientes al kit “α5β1 integrin investigator” (Chemicon International), los cuales son específicos a dicha integrina y pueden usarse en células

endoteliales. Los anticuerpos fueron: el anticuerpo monoclonal anti- β 1 humana clon P4G11 (MAB1951Z-20, Chemicon International), el cual es un anticuerpo que ocupa el sitio activo dependiente de calcio de la integrina α 5 β 1 y que induce su adhesión a fibronectina; el anticuerpo anti- α 5 β 1 clon HA5 (MAB1999-20, Chemicon International), el cual se une al heterodímero de forma neutra, sin afectar la adhesión a fibronectina; y el anticuerpo anti- α 5 clon P1D6 (MAB1956Z-20, Chemicon International), el cual bloquea la actividad de la integrina α 5 β 1 mediante su unión específica a la subunidad α 5. Los anticuerpos fueron empleados a una concentración final de 5 μ g/mL en co-tratamiento con los factores de crecimiento y la vasoinhibina. El método de click se llevó a cabo como se describió anteriormente.

6.3 Cuantificación de la expresión de la integrina α 5 β 1 en HUVEC en respuesta a vasoinhibina, VEGF y bFGF.

6.3.1 qRT-PCR

Para analizar posibles cambios relativos en la expresión génica de la integrina α 5 β 1, se aisló el ARN total con Trizol (Sigma-Aldrich, cat. T9424) a las 16 h de iniciados los tratamientos. La transcripción reversa se realizó a partir de 100 ng/ μ L del ARN extraído de cada muestra y el estuche de transcripción inversa de gran capacidad (High-Capacity ADNc Reverse Transcription kit, Thermo Fisher Scientific, cat. K1081). Los cambios en la expresión génica de la integrina α 5 β 1 fueron evaluados mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) empleando el ADNc sintetizado, la mezcla Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, cat. K0221) y los siguientes *primers*: ITGA5 humano *forward* 5'-TTCAACTTAGACGCGGAGGC-3', ITGA5 humano *reverse* 5'-ATTCAATGGGGGTGCACTGT-3', ITGB1 humano *forward* 5'-ACTGATTGGCTGGAGGAATGTTAC-3', ITGB1 *reverse* 5'-CTGGACAAGGTGAGCAATAGAAGG-3', GAPDH humano *forward* 5'-GTCCACTGGCGTCTTCACCA-3' y GAPDH humano *reverse* 5'-GTGGCAGTCATGGCATGGAC-3' a una concentración final de 0.5 μ M. La cuantificación de los datos obtenidos se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001) empleando el gen GAPDH como control interno.

6.3.2 Inmunodetección por Western blot

Para evaluar los cambios en los niveles proteicos de la integrina $\alpha 5\beta 1$, se obtuvieron lisados de las HUVEC a las 16 h de iniciados los tratamientos. Se procesaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, cat. 1620112), que se bloqueó con leche al 4% en 0.1% Tween-PBS e incubó toda la noche con anticuerpos policlonales anti-ITGA5 (1:2500, Sigma-Aldrich, cat. HPA002642) o anti-ITGB1 (1:500, Sigma-Aldrich, cat. SAB4300655) y anti- β -tubulina (1:5000, Abcam, cat. 15568); este último como control de carga para la normalización. Después de tres lavados con 0.1% Tween-PBS, las proteínas inmunoreactivas se detectaron con anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina (Santa Cruz, cat. SC-2771) y una reacción colorida (AP Color Development 25 X, Bio-Rad, cat. 1706432). La cuantificación de las bandas inmunorreactivas se realizó mediante densitometría y el software Image J (Schneider *et al.*, 2012).

7. RESULTADOS

7.1 La vasoinhibina inhibe la proliferación de las HUVEC inducida con VEGF y bFGF

Para poder evaluar el efecto de la inmunoneutralización de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre la propiedad de la vasoinhibina de inhibir la proliferación de células endoteliales, primero se estableció el método para medir la proliferación de las HUVEC empleando el análogo de timidina EdU y su detección con el método de click. El porcentaje de células proliferantes (observadas a 570 nm) con respecto al total de células co-teñidas con Hoechst 33342 (observado a 400 nm) es una medida directa de la proliferación celular. En condiciones basales aproximadamente el 30% de las HUVEC sintetizaron ADN, cuando se estimularon con una combinación de 25 ng/mL de VEGF y 20 ng/mL de bFGF el porcentaje de células proliferantes aumentó a 55% (Figura 6). El co-tratamiento con 100 nM de vasoinhibina evitó este aumento en la proliferación ya que el porcentaje de células proliferantes fue de 35% (Figura 6). Asimismo, el tratamiento con vasoinhibina en condiciones basales no afectó la proliferación basal de las HUVEC.

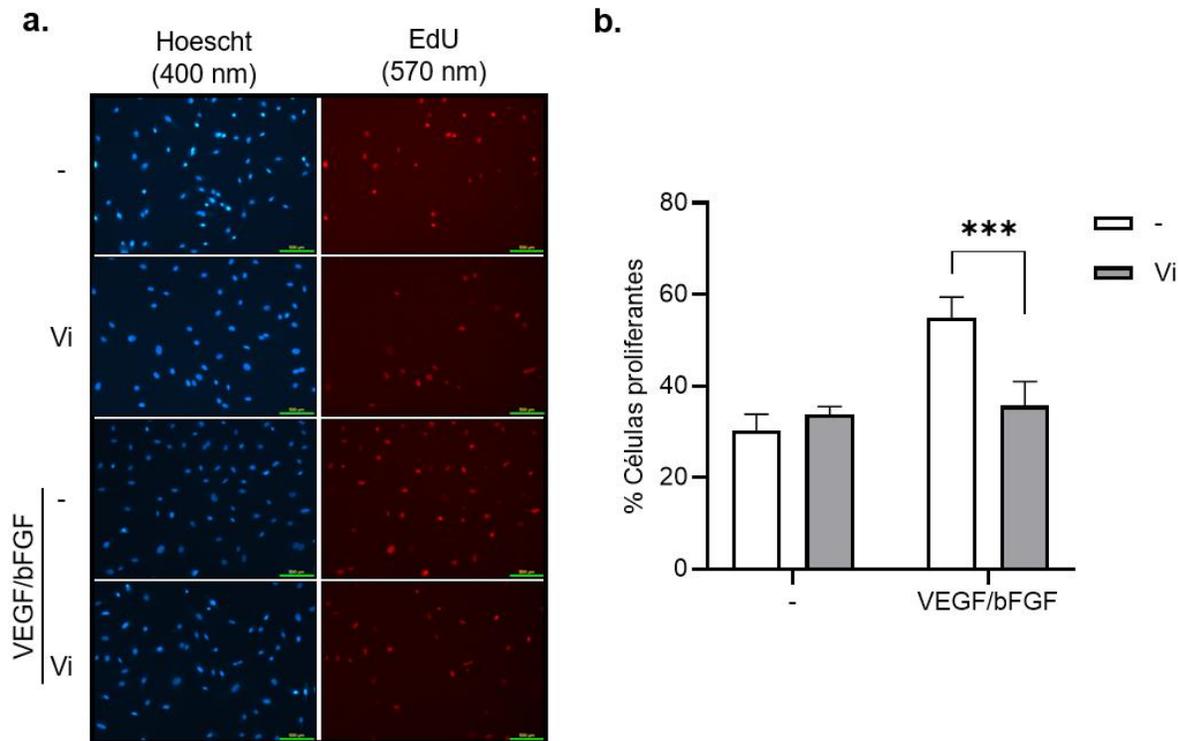


Figura 6. Acción inhibitoria de la vasoinhibina sobre la proliferación de las HUVEC inducida por VEGF y bFGF. **a.** Microfotografías representativas de las HUVEC tratadas o no con una combinación de 25 ng/mL de VEGF y 20 ng/mL de bFGF en presencia o ausencia de 100 nM de vasoinhibina. Las HUVEC se co-trataron con EdU por 24 h, el ADN sintetizado se localizó con azida fluorescente (570 nm) y el núcleo celular con Hoechst 33342 (400 nm). Se muestra en las imágenes una barra de referencia (en verde) correspondiente a 500 μ m. **b.** Cuantificación del porcentaje de células proliferantes relativa al total de células. Los valores son la media \pm la desviación estándar de triplicados de 3 experimentos independientes (***) $p < 0.001$, ANOVA de dos vías, posthoc: Tukey).

7.2 Anticuerpos específicos contra la integrina $\alpha 5\beta 1$ bloquean la acción inhibitoria de la vasoinhibina sobre la proliferación de HUVEC

Para realizar la inmunoneutralización de la integrina $\alpha 5\beta 1$ se emplearon los anticuerpos: anti- $\alpha 5$ (bloqueador), anti- $\alpha 5\beta 1$ (neutro) y anti- $\beta 1$ (estimulador, en términos de unión de la integrina a su ligando fibronectina) (Damiano *et al.*, 2014; Forsyth *et al.*, 2002). Los anticuerpos anti- $\alpha 5$ y anti- $\alpha 5\beta 1$ no tuvieron efecto sobre la proliferación basal

y estimulada por VEGF y bFGF (Figura 7a), pero sí el anticuerpo anti- $\beta 1$, el cual disminuyó la proliferación inducida por los factores VEGF y bFGF (Figura 7b). Como era de esperarse, el tratamiento con vasoinhibina inhibió la proliferación de HUVEC solamente cuando esta fue estimulada con VEGF y bFGF. El efecto inhibitorio de la vasoinhibina se bloqueó en presencia de todos los anticuerpos, anti- $\alpha 5$, anti- $\alpha 5\beta 1$ y anti- $\beta 1$ (Figura 7).

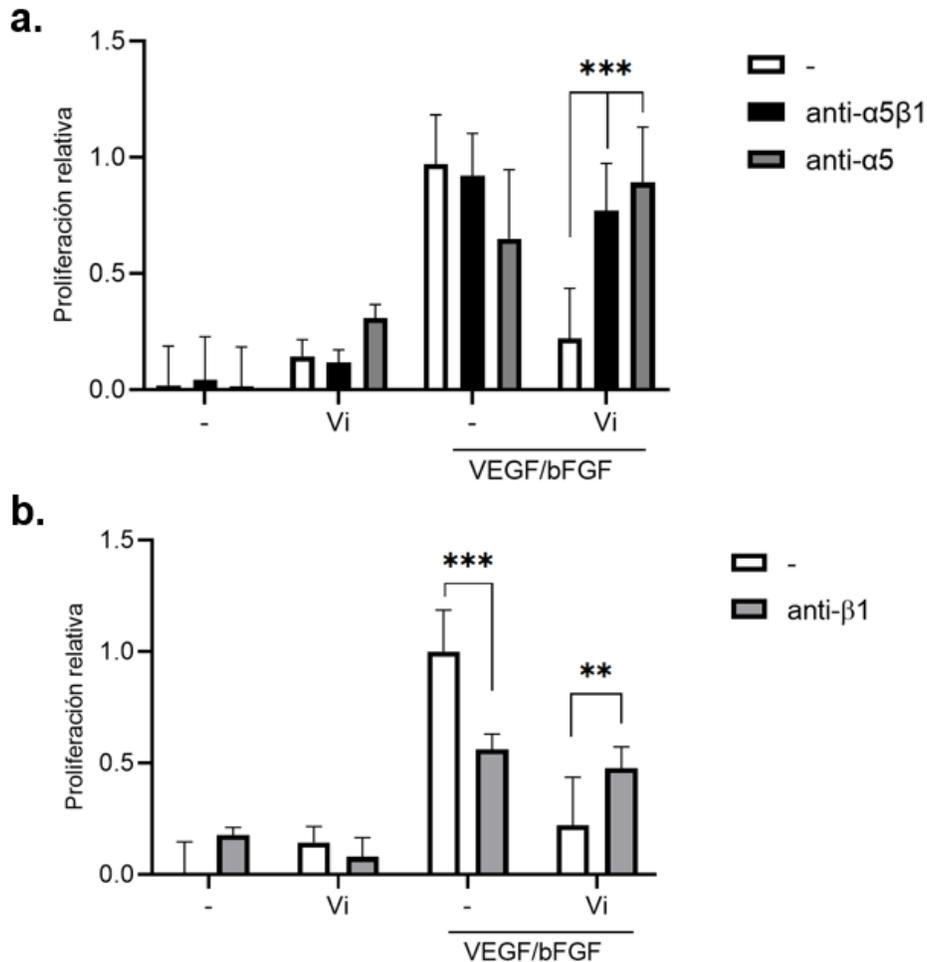


Figura 7. Efecto de la inmunoneutralización de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre la acción inhibitoria de la vasoinhibina en la proliferación de HUVEC. Proliferación de HUVEC relativa al total de células proliferantes estimuladas con 25 ng/mL VEGF y 20 ng/mL bFGF. Las HUVEC se cotrataron o no con 100 nM de vasoinhibina (Vi) y los anticuerpos anti- $\alpha 5$, $\alpha 5\beta 1$ (a) y anti- $\beta 1$ (b) a una concentración de 5 μ g/mL por 24 h. Los valores son la media \pm la desviación estándar de triplicados de 3 experimentos independientes (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; ANOVA de dos vías, posthoc: Sidak).

7.3 La vasoinhibina eleva la expresión del ARN mensajero (ARNm) de la subunidad $\beta 1$ de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en HUVEC

Ya que la inmunoneutralización de la integrina $\alpha 5\beta 1$ bloquea la actividad antiproliferativa de la vasoinhibina, nos preguntamos si la vasoinhibina regula la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Por lo tanto, se evaluó mediante qRT-PCR la expresión del ARNm de las subunidades que conforman a la integrina $\alpha 5\beta 1$ en las HUVEC. En la figura 8 se muestran los cambios en la expresión de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ previamente normalizados respecto a la expresión del gen de referencia GAPDH y relativos a los niveles de expresión de HUVEC sin tratamientos (control). Respecto al ARNm de la subunidad $\alpha 5$ (figura 8a) encontramos que la vasoinhibina no aumenta significativamente su expresión. En contraste, la expresión del ARNm de la subunidad $\beta 1$ (figura 8b) aumentó por la vasoinhibina tanto en ausencia como presencia de VEGF y bFGF. El tratamiento único con VEGF y bFGF no modificó la expresión de la subunidad $\alpha 5$ y $\beta 1$ respecto al control.

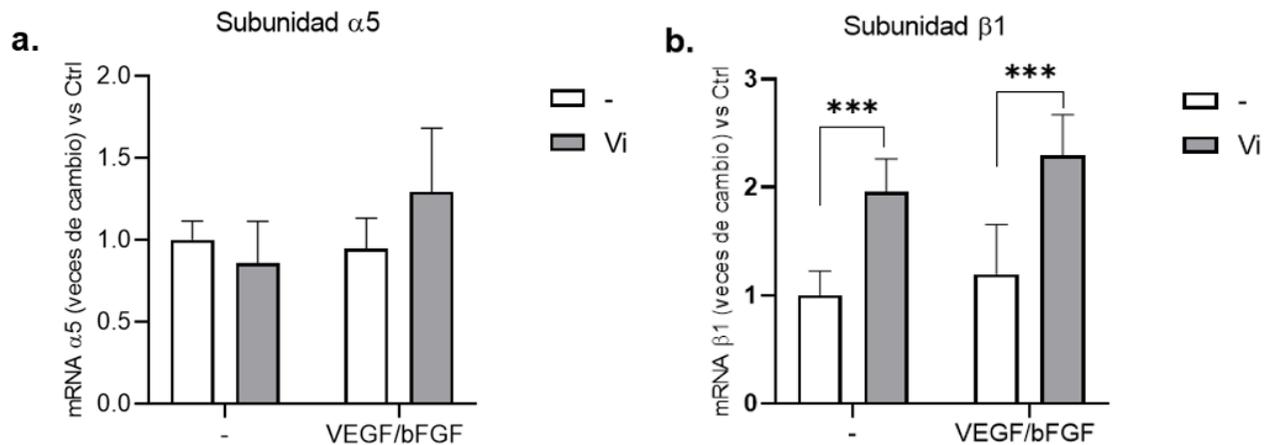


Figura 8. Efecto de la vasoinhibina sobre los niveles del ARNm de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ en HUVEC. Evaluación por qRT-PCR del ARNm de la subunidad $\alpha 5$ (a) y $\beta 1$ (b) en HUVEC incubadas o no con VEGF (25 ng/mL) y bFGF (20 ng/mL) en presencia o ausencia (-) de vasoinhibina (Vi, 100 nM) por 16 h. Los valores son la media \pm la desviación estándar, $n=6$ (* $p<0.05$, *** $p<0.001$; ANOVA de dos vías, posthoc: Sidak).

7.4 Análisis del efecto de la vasoinhibina sobre la concentración de las proteínas $\alpha 5$ y $\beta 1$ en HUVEC

Para analizar si el aumento en la expresión del ARNm de la subunidad $\beta 1$ se traduce en más proteína, evaluamos la concentración proteica de las subunidades de la integrina $\alpha 5\beta 1$ mediante Western blot. La figura 9 presenta Western blots representativos de tres experimentos independientes. No observamos cambios en el nivel de la subunidad $\alpha 5$ por efecto de los diversos tratamientos (figura 9a) ni de la subunidad $\beta 1$ (Figura 9b) relativos a los niveles de ambas proteínas en las HUVEC sin tratamiento (control). Al igual que para el ARNm, el tratamiento único con VEGF y bFGF no modificó la expresión de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$. Es interesante que a diferencia del ARNm el nivel proteico de las dos subunidades de la integrina no parece modificarse por el tratamiento con vasoinhibina, lo que sugiere que la vasoinhibina no actúa a través de modificar la producción de la integrina $\alpha 5\beta 1$.

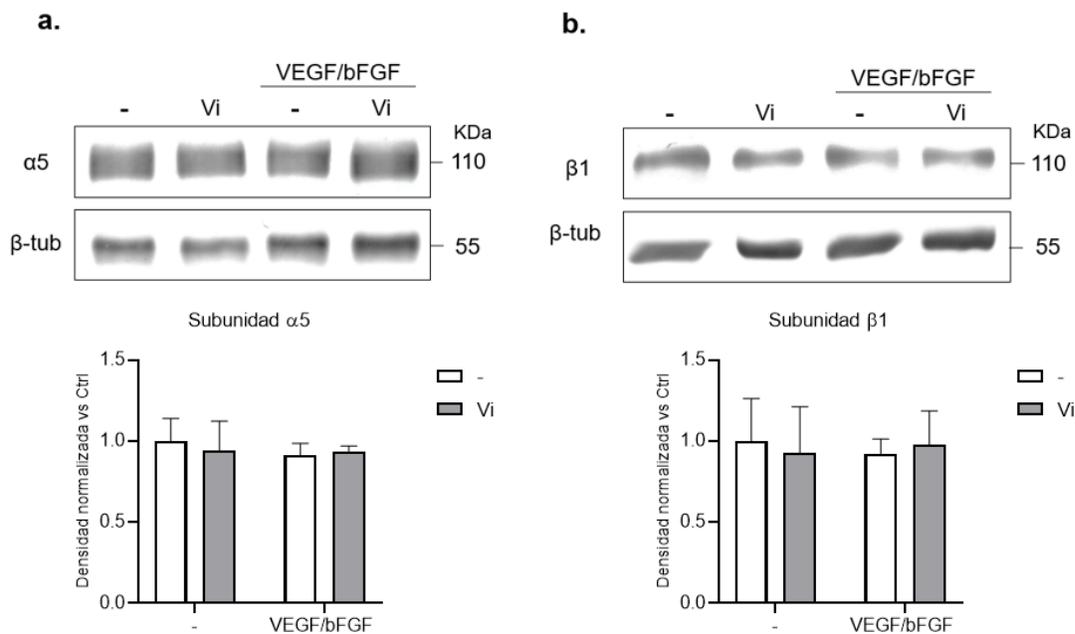


Figura 9. Evaluación por Western blot de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 1$ en HUVEC.

Western blot representativo para las subunidades $\alpha 5$ (a) y $\beta 1$ (b) en HUVEC incubadas o no con VEGF (25 ng/mL) y bFGF (20 ng/mL) en presencia o ausencia (-) de vasoinhibina (Vi, 100 nM) por 16 h. Los valores son la media \pm la desviación estándar de seis experimentos independientes (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; ANOVA de dos vías, posthoc: Sidak).

8. DISCUSIÓN

La angiogénesis es esencial en el desarrollo embrionario, el remodelamiento de tejidos en eventos reproductivos de las hembras y tiene influencia en la progresión de distintas enfermedades. Por lo tanto, la vasoinhibina ha emergido como un importante inhibidor endógeno de la angiogénesis e incluso la alteración en su producción favorece el desarrollo de patologías como la retinopatía diabética, artritis reumatoide, pre-clampsia y cardiomiopatía del periparto (Clapp *et al.*, 2009, 2015).

La vasoinhibina interfiere con la acción de factores pro-angiogénicos (VEGF, bFGF, bradicinina, IL-1 β) sobre las células endoteliales que resulta en el bloqueo de vías de señalización como Ras-Raf-MAPK, Ras-Tiam1-Rac1-Pak1, NF- κ B, PI3K-Akt y PLC γ -IP3-Ca²⁺-CaM-eNOS (Clapp *et al.*, 2015). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de un posible receptor putativo. Al respecto, se ha reportado que la vasoinhibina requiere la unión al complejo PAI-1/uPA/uPAR en membranas de células endoteliales para llevar a cabo sus acciones antiangiogénicas (Bajou *et al.*, 2014), pero se desconoce cómo este complejo multimérico participa en la señalización de la vasoinhibina. Dado que se tienen evidencias de que el uPAR interacciona con integrinas (Chaurasia *et al.*, 2006; Kugler *et al.*, 2003; Tarui *et al.*, 2003), que las integrinas regulan la angiogénesis (Avraamides *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2000) y que, en particular, la integrina α 5 β 1 media efectos proapoptóticos de la vasoinhibina (Morohoshi *et al.*, 2018), podría ser que la interacción del complejo PAI-1/uPA/uPAR con la integrina α 5 β 1 determine la señalización de la vasoinhibina sobre la inhibición de la angiogénesis. Por lo anterior, en esta tesis exploramos la contribución de la integrina α 5 β 1 en el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la proliferación endotelial. En apoyo a esta posibilidad, mostramos que los anticuerpos anti- α 5, anti- β 1 y anti- α 5 β 1 bloquean el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la proliferación de las HUVEC inducida por factores proangiogénicos.

Las integrinas se conforman por las subunidades heterodiméricas α y β . La subunidad β 1 es la que forma un mayor número de combinaciones con distintas subunidades α dando lugar a 12 integrinas distintas en humanos. Cabe mencionar que la subunidad α determina la especificidad de unión a las distintas proteínas de matriz. Diversas integrinas se expresan en el endotelio vascular y tienen relación con algún aspecto de la

angiogénesis ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$) incluyendo la unión a factores endógenos reguladores de la angiogénesis (Mettouchi y Meneguzzi, 2006). Por ejemplo, se ha reportado que particularmente las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ median la proliferación inducida por factores como VEGF y bFGF (Mettouchi *et al.*, 2001; Senger *et al.*, 2002). Todas ellas tienen en común a la subunidad $\beta 1$. Nosotros observamos que la adición del anticuerpo anti- $\beta 1$, pero no así la de los anticuerpos anti- $\alpha 5$ y anti- $\alpha 5\beta 1$, reduce la estimulación de la proliferación de las HUVEC en respuesta a la combinación de VEGF y bFGF, lo que apoya la acción preponderante de la cadena $\beta 1$ en dicho efecto.

El anticuerpo anti- $\beta 1$ es estimulador de la integrina $\alpha 5\beta 1$, lo que quiere decir que favorece su estado activo de adhesión a la fibronectina de la ECM, por lo que el efecto negativo observado en la inducción de la proliferación podría deberse a que las células permanecen mayormente adheridas a la ECM y no se despegan para proliferar en respuesta a los factores de crecimiento VEGF y bFGF.

En particular, la integrina $\alpha 5\beta 1$ también tiene un rol importante en la angiogénesis patológica. Taverna y Hynes (2001) describen el desarrollo de un tumor de células germinales (teratocarcinoma) en ratones *knockout* para la subunidad $\alpha 5$. La ausencia de dicha subunidad reduce la vascularización y proliferación del tumor, y aumenta su apoptosis. Además, dicho ratón muestra defectos en el mesodermo, regresión por apoptosis de la cresta neural y consecuente desarrollo vascular deficiente. Por su parte, el fenotipo del *knockout* para la subunidad $\beta 1$ es letal antes de la gastrulación (Hynes, 2002).

Como ya se mencionó, varias integrinas se expresan en el endotelio vascular y participan en distintos aspectos de la angiogénesis, uno de los cuales es la mediación de la acción de inhibidores endógenos de la angiogénesis. Por ejemplo, la tumstatina induce la apoptosis e inhibe la proliferación celular a través de la integrina $\alpha v\beta 3$; la arrestina compete con la unión de la integrina $\alpha 1\beta 1$ para mediar su señalización; la canstatina se une a las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ para desencadenar la apoptosis vía caspasas 8 y 9; la angiostatina se une a la integrina $\alpha v\beta 3$ desencadenando la apoptosis vía caspasa 8; y la endostatina ejerce su actividad inhibitoria sobre la migración endotelial y la formación tubular a través de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Mettouchi y Meneguzzi, 2006; Serini *et al.*, 2008).

Morohoshi y colaboradores (2018) evaluaron la capacidad de unión de la vasoinhibina a las integrinas $\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ mediante un ensayo de unión. Si bien la vasoinhibina se unió a todas estas integrinas, la capacidad de unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ fue la más alta entre las integrinas examinadas, incluso superior a la de esta integrina con su sustrato natural la fibronectina. Además, la estabilidad de dicha unión entre vasoinhibina e integrina $\alpha 5\beta 1$ permitió su coinmunoprecipitación.

En el caso de la endostatina que se conoce actúa a través de la integrina $\alpha 5\beta 1$, se ha mostrado que anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ bloquean su acción antiangiogénica (Sudhakar *et al.*, 2003), pero se desconoce el mecanismo involucrado. De la misma forma, la inmunoneutralización de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con anti- $\beta 1$ y anti- $\alpha 5\beta 1$ bloquea el efecto inductor de la apoptosis de la vasoinhibina sobre células HUVEC (Morohoshi *et al.*, 2018). Consistentemente con estos hallazgos, en este trabajo mostramos que los tres anticuerpos empleados específicos de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (anti- $\alpha 5$, anti- $\beta 1$ y anti- $\alpha 5\beta 1$) reducen la acción inhibitoria de la vasoinhibina sobre la proliferación inducida con VEGF y bFGF de las HUVEC. El efecto neutralizante fue más evidente con los anticuerpos anti- $\alpha 5$ y anti- $\alpha 5\beta 1$ que con el anticuerpo anti- $\beta 1$ (figura 7). Se conoce que la vasoinhibina se une a la subunidad $\beta 1$ de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Morohoshi *et al.*, 2018) y, es posible, que la unión de la vasoinhibina a esta subunidad modifique la funcionalidad de su interacción con la cadena $\alpha 5$ y, por lo tanto, que ambas subunidades $\beta 1$ y $\alpha 5$ influyan sobre el efecto anti-proliferativo de la vasoinhibina.

Referente a la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en las HUVEC no cambió con el tratamiento con los factores de crecimiento VEGF y bFGF a nivel génico ni proteico. Esto a pesar de que se conoce bien la participación de esta integrina en la proliferación de células endoteliales y en la angiogénesis *in vivo*. Sin embargo, este no es un resultado sorprendente pues se ha reportado que el VEGF no altera la expresión de la subunidad $\alpha 5$ o $\beta 1$, por si solo o en combinación con otras citocinas, tales como bFGF o TGF- $\beta 1$ en células de la microvasculatura de la piel evaluadas en varios intervalos después del tratamiento desde 0.5 a 48 h (Senger *et al.*, 1996). En el caso del bFGF, está reportado que en algunas líneas celulares endoteliales provoca un aumento modesto en los niveles de ARNm tanto de la subunidad $\alpha 5$ como de $\beta 1$, observando los efectos máximos

después de 12 horas y a dosis mayores a 30 ng/mL; sin embargo, los efectos exacerbados del bFGF sobre este aumento en la expresión génica se dan en sinergia con TGF- β 1 (Collo y Pepper, 1999). A este respecto, es posible que otras dosis o tiempos diferentes a los empleados en el presente estudio puedan poner de manifiesto posibles efectos estimuladores del VEGF y del bFGF sobre la expresión de la integrina α 5 β 1 en las HUVEC.

Por otro lado, la vasoinhibina estimuló la expresión del ARNm de la subunidad β 1 tanto en ausencia como en presencia de VEGF y bFGF. A pesar de esto, la expresión incrementada de los transcritos no se manifestó a nivel de las proteínas, lo cual sugiere que este efecto no es funcionalmente relevante. También cabe mencionar que el Western blot es una técnica poco sensible y semicuantitativa, limitaciones que podrían interferir con la obtención de conclusiones certeras y que, en el mejor de los casos, sugieren el que un posible aumento en respuesta a la vasoinhibina sería muy modesto.

El mecanismo por el cual la integrina α 5 β 1 participa en los efectos inhibidores de la vasoinhibina no es claro. Se ha mostrado que la vasoinhibina se une directamente a la subunidad β 1 (Morohoshi *et al.*, 2018) y es posible que dicha unión pudiera restarle funcionalidad. La subunidad β 1 está presente en varias integrinas relacionadas con la proliferación de células endoteliales (Mettouchi y Meneguzzi, 2006) y se sabe que los tipos de señales provocadas por las integrinas se comparten estereotípicamente con las inducidas por los receptores de factores de crecimiento (Comoglio *et al.*, 2003). Por ejemplo, las tirosina-quinasas citoplásmicas que se activan por unión celular, como la quinasa de adhesión focal (FAK) y Fyn, desencadenan una serie de cascadas de señalización comunes a las generadas por los RTKs para los factores de crecimiento (figura 10). Las integrinas pueden cooperar con los receptores de factores de crecimiento para contribuir a su transactivación y con ella a eventos de transducción de señales intracelulares, en particular, la activación de la vía MAPK (Short *et al.*, 1998) que se conoce es antagonizada por la vasoinhibina (Clapp *et al.*, 2006). Al respecto, nuestro trabajo deja abierta la posibilidad de explorar si el efecto de la vasoinhibina estimulador de la actividad de la GTPasa de Ras, que interfiere con la activación de Ras inducida por

factores angiogénicos (D'Angelo *et al.*, 1999), se bloquea en presencia de anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$.

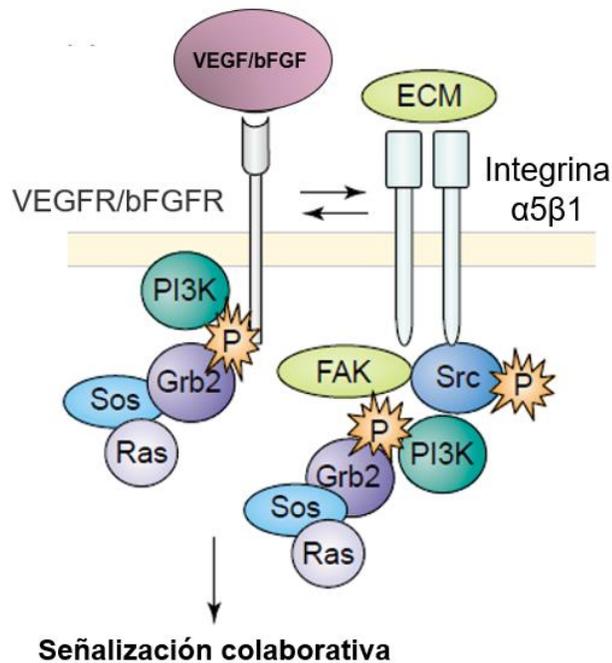


Figura 10. Interacción entre la integrina $\alpha 5\beta 1$ y receptores de factores de crecimiento (VEGFR y bFGFR). La señalización de los receptores de factores de crecimiento y de la integrina $\alpha 5\beta 1$ involucra vías paralelas que generan una activación aditiva de las cascadas de señalización y convergen con efectores comunes (modificada de Comoglio *et al.*, 2003).

Los mecanismos que regulan a las integrinas se ejercen a nivel de su expresión y de su actividad e incluyen: mecanismos transcripcionales o postranscripcionales (la alteración de la estructura de las proteínas resultantes mediante el corte y empalme alternativo del ARNm), la movilización a la superficie celular de las reservas intracelulares preexistentes de integrinas, la modulación de la actividad de sus ligandos y los cambios en su conformación que regulan su funcionalidad (Kim y Yamada, 1997). En cuanto a este último aspecto, las integrinas en su estado inactivo adoptan una conformación “doblada” donde los dominios citoplásmicos de las subunidades α y β se encuentran entrelazados, en esta conformación existe una baja afinidad a ligandos. Para su

activación son necesarias interacciones bioquímicas y tensión mecánica que permiten la separación de los dominios citoplásmicos de las subunidades α y β , lo cual desencadena un cambio conformacional en los dominios extracelulares a una forma de la integrina “desdoblada” y “extendida”, que confiere una mayor afinidad a los ligandos. Dicha conformación permite la unión de proteínas efectoras en los dominios citoplásmicos que median no solo la activación de la integrina, sino también la agrupación de las integrinas en complejos de adhesión (figura 11) (Kechagia *et al.*, 2019).

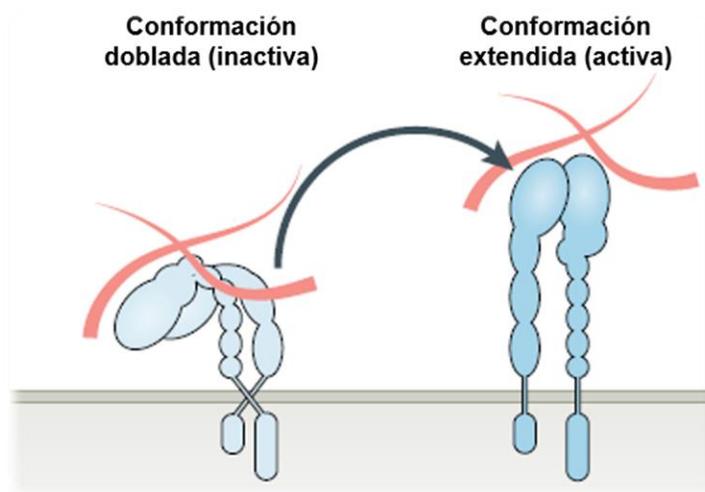


Figura 11. Conformación de las integrinas. La conformación “doblada” es la forma inactiva de las integrinas (izquierda) ya que cuentan con menor afinidad a ligandos, contariamente a la conformación “extendida” (derecha) que es su forma activa con mayor afinidad a ligandos, interacción con ECM y agrupación de proteínas efectoras (Kechagia *et al.*, 2019).

Existen reportes que demuestran que la regulación dinámica en la activación conformacional de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ se puede dar mediante su unión con distintas moléculas, una de ellas el uPAR, ya que dicha unión implica un cambio conformacional en sus dominios extracelulares generando un estado activo de la integrina y así, favoreciendo la unión de ligandos. Por ejemplo, Herkenne y colaboradores (2015) reportan que en la señalización del VEGF, al unirse este a su receptor VEGFR2, se

induce la formación de un complejo que involucra uPAR y la integrina β_1 . La formación de este complejo VEGF/VEGFR2/uPAR/ β_1 a nivel membranal promueve la transducción de señales en procesos celulares *in vitro* como la proliferación, migración y permeabilidad, e *in vivo* como la neovascularización. Modelos *knockout* del receptor uPAR o su bloqueo con anticuerpos evitan que estos procesos se lleven a cabo por promoción de la señalización del VEGF. También los autores reportan que este complejo es internalizado ya que el uPAR atrae a la proteína LRP que internaliza el complejo de forma endosomal, y este complejo en el endosoma no se dirige a degradación, en su lugar la señalización continúa dentro del endosoma, modificando su intensidad y duración (Figura 12). También se reportó que a este complejo se le puede unir uPA y PAI-1 y, además, pueden ser igualmente internalizados cuando se unen de manera extracelular.

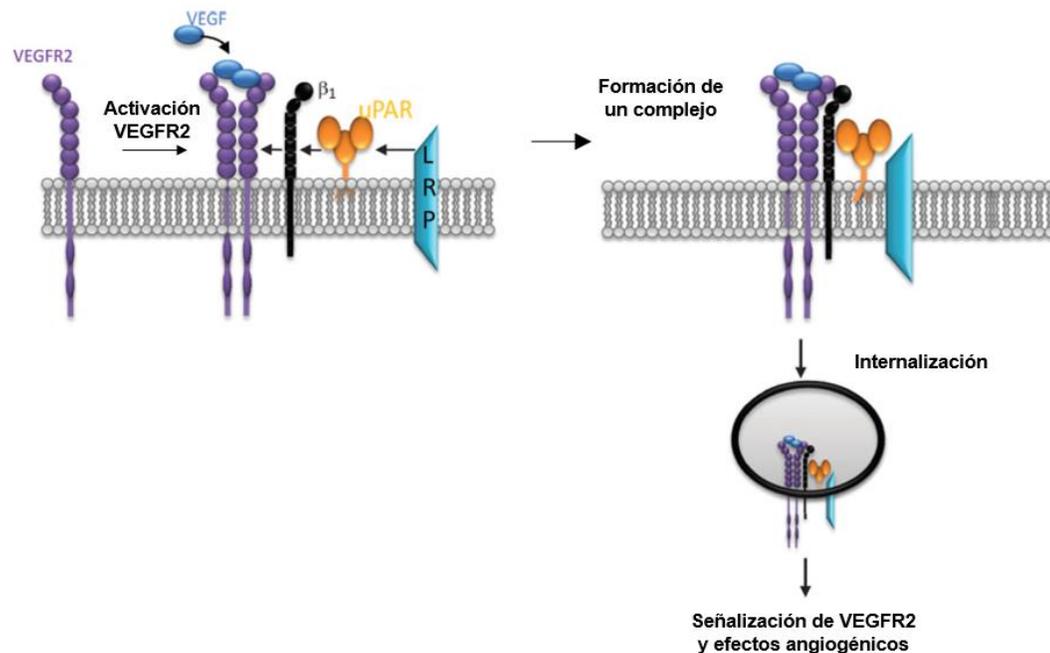


Figura 12. Formación de un complejo multiproteico inducido por la señalización del VEGF en la membrana de células endoteliales. La unión de VEGF a su receptor VEGFR2 induce su activación y la unión de la integrina β_1 , que a su vez atrae a uPAR al complejo. uPAR recluta a la proteína LRP-1 la cual desencadena la internalización del complejo ampliando la señalización de VEGFR2 dentro de la célula (Herkenne *et al.*, 2015).

Otra evidencia de la formación de un complejo, es el compuesto por la integrina $\alpha 5\beta 1$ /uPA/uPAR (Wei *et al.*, 2005). La integrina $\alpha 5\beta 1$ de forma basal puede estar en un estado inactivo el cual transita a un estado activo, por ejemplo, con la unión de la integrina a su sustrato natural la fibronectina en la ECM. Se ha reportado que cuando el receptor uPAR se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$ promueve el ensamblaje de la fibronectina y con esto la migración celular. Además, la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a fibronectina se promueve con la unión de uPAR, ya que al unirse este a la integrina $\alpha 5\beta 1$ se genera un cambio conformacional en ésta, exponiendo sitios de unión a fibronectina diferentes a los de unión a las secuencias RGD. Las secuencias RGD se encuentran en la fibronectina y es donde comúnmente se une la integrina $\alpha 5\beta 1$ mediante sus sitios de unión específicos, por lo que adicionar péptidos con la secuencia análoga a RGD provoca que se unan a dichos sitios específicos en la integrina y por lo tanto es una estrategia para bloquear la adhesión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a la fibronectina. De esta forma experimental, Wei y colaboradores (2005) demostraron que, en presencia de uPAR, la adición de péptidos RGD no bloquea la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a la fibronectina porque ésta se lleva a cabo mediante sitios diferentes a RGD; entonces, la formación del complejo uPAR/ $\alpha 5\beta 1$ promueve la adhesión a la ECM. Cuando a este complejo se agrega PAI-1, el inhibidor de uPA, ocurre un desprendimiento de la ECM. PAI-1 se une al uPA unido al uPAR, ocasionando un cambio en la interacción de uPAR con la integrina $\alpha 5\beta 1$, por lo que ya no se estimula la unión a la ECM y las células se desprenden de ella.

Estas evidencias indican que las moléculas como VEGFR2, uPAR e integrina $\alpha 5\beta 1$, están altamente relacionadas y es necesaria la respuesta integrada de éstas para la estimulación de la angiogénesis, promoviendo eventos de proliferación y migración endotelial (Binder *et al.*, 2007; Herkenne *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2005). De acuerdo con lo anterior, nosotros proponemos que la vasoinhibina interrumpe la intercomunicación entre las moléculas antes mencionadas y de esta forma inhibe la angiogénesis. Sabemos que la vasoinhibina es dependiente de PAI-1 y que este debe estar unido a un complejo formado por uPA/uPAR para que la vasoinhibina pueda tener efectos antiangiogénicos (Bajou *et al.*, 2014). La vasoinhibina es capaz de unirse a este complejo y también a la

integrina $\alpha 5\beta 1$, esta última capaz de mediar el efecto proapoptótico de la vasoinhibina (Morohoshi *et al.*, 2018). Por lo tanto, la propuesta conjunta es que la vasoinhibina interacciona con PAI-1 y a su vez, se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$, específicamente en su subunidad $\beta 1$ (Morohoshi *et al.*, 2018), lo que ocasiona un cambio conformacional en la integrina $\alpha 5\beta 1$ que pudiera generar: (1) el antagonismo en el efecto de PAI-1 de desprender las células de la ECM y por lo tanto, probablemente favorecer y estimular la adhesión de las células endoteliales; y (2) la interrupción en la intercomunicación con VEGFR y bFGFR, evitando la transactivación de estos receptores inducida por la integrina $\alpha 5\beta 1$, con lo cual se inhibe la proliferación de las células endoteliales. La integrina $\alpha 5\beta 1$ media efectos proliferativos y comparte la vía de señalización de las MAPK con el VEGFR, por lo que probablemente la unión de la vasoinhibina evita la interacción entre $\alpha 5\beta 1$ y VEGFR y con ello, la interrupción de esta vía de señalización. Se sabe que la vasoinhibina es capaz de interrumpir la vía de las MAPK a nivel de Ras, mediante la inducción de su fosfatasa y el aumento del AMPc (Figura 13), y es esta vía la compartida en sinergia entre la integrina $\alpha 5\beta 1$ y VEGFR.

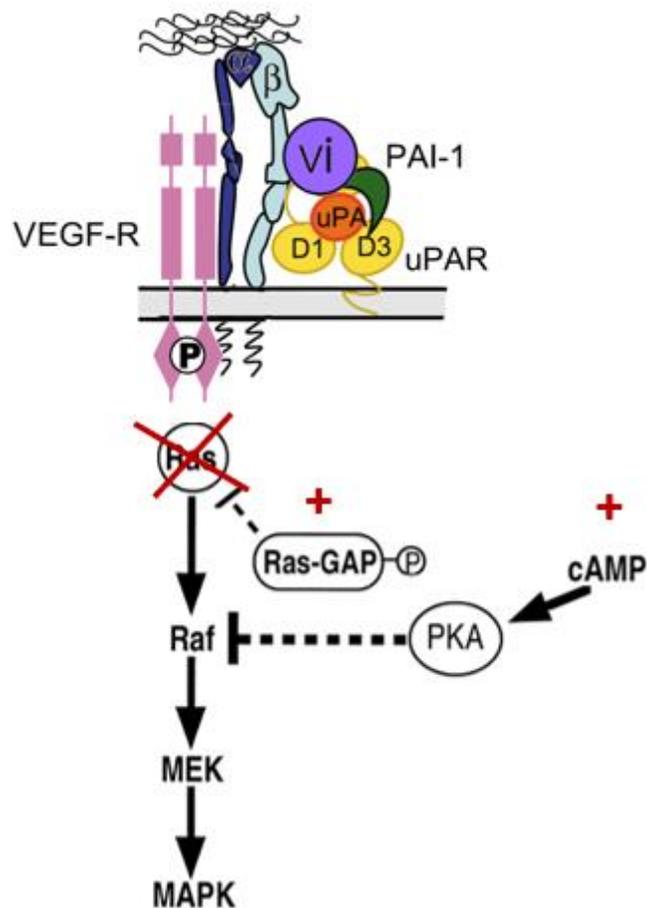


Figura 13. Modelo propuesto de la señalización de la vasoinhibina a través de la integrina $\alpha 5 \beta 1$. La vasoinhibina se une a la integrina $\alpha 5 \beta 1$ en su subunidad $\beta 1$ interfiriendo con la intercomunicación de esta con el VEGFR2 y el uPAR, este último también interferido a partir de la interacción de la vasoinhibina con el PAI-1 en el complejo PAI-1/uPA/uPAR. La cascada de señalización compartida entre estas moléculas es la vía de las MAPK que corresponde a la vía bloqueada por la vasoinhibina a nivel de la proteína efectora Ras (imagen elaborada por la autora de esta tesis).

Los hallazgos en el presente estudio son consistentes con nuestra hipótesis de que la integrina $\alpha 5 \beta 1$ participa en el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo. Es claro que hay elementos con los que se puede fundamentar un antagonismo en la señalización del VEGF y en el efecto promotor de la angiogénesis del PAI-1, vía la vasoinhibina a través de la integrina $\alpha 5 \beta 1$. Esto

probablemente, a partir de fortalecer la unión de las células endoteliales a la ECM, por lo que no pueden desprenderse para responder a las señales mitogénicas de los factores proangiogénicos.

Con dichos resultados, queda abierta la posibilidad de explorar estos efectos. Al respecto, ensayos de adhesión permitirán evaluar si efectivamente la vasoinhibina promueve la adhesión de las células endoteliales a fibronectina, el sustrato natural y principal ligando de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Asimismo, estudios futuros podrán evaluar la activación de la vía de las MAPK en presencia de anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$, para tener una idea más clara del uso de este mecanismo por parte de la vasoinhibina para bloquear esta vía en la señalización celular que confluye a la angiogénesis.

9. CONCLUSIÓN

La integrina $\alpha 5\beta 1$ participa en el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la proliferación de las células endoteliales.

10. BIBLIOGRAFÍA

Apte, R.S., Chen, D.S., and Ferrara, N. (2019). VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development. *Cell* 176, 1248–1264.

Arnold, E., Rivera, J.C., Thebault, S., Moreno-Páramo, D., Quiroz-Mercado, H., Quintanar-Stéphano, A., Binart, N., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2010). High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes* 59, 3192–3197.

Avraamides, C.J., Garmy-Susini, B., and Varnier, J.A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8, 604–617.

Bajou, K., Herkenne, S., Thijssen, V.L., D'Amico, S., Nguyen, N.-Q.-N., Bouché, A., Tabruyn, S., Srahna, M., Carabin, J.-Y., Nivelles, O., Paques, C., Cornelissen, I., Lion, M., Noel, A., Gils, A., Vinckier, S., Declerck, P. J., Griffioen, A. W., Dewerchin, M., Marchial, J. A., Carmeliet, P., and Struman, I. (2014). PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nat Med* 20, 741–747.

Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., and Vaubourdolle, M. (2007). A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2, 481–485.

Bentzien, F., Struman, I., Martini, J.-F., Martial, J., and Weiner, R. (2001). Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1^{-/-} Mice. *Cancer Res* 61, 14.

Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 592–603.

Binder, B.R., Mihaly, J., and Prager, G.W. (2007). uPAR – uPA – PAI-1 interactions and signaling: A vascular biologist's view. *Thromb Haemost* 97, 336-342.

Bloch, W., Forsberg, E., Lentini, S., Brakebusch, C., Martin, K., Krell, HW., Weidle UH, Addicks K., and Fassler R. (1997) Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol.*139, 265–278.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., and Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocr Rev* 19, 225–268.

Cao, Y. (2001). Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 357–369.

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

Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I., Friman, O., Guertin, D.A., Chang, J., Lindquist, R.A., Moffat, J., Golland, P., and Sabatini, D. M. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7, R100.

Chaurasia, P., Aguirre-Ghiso, J.A., Liang, O.D., Gardsvoll, H., Ploug, M., and Ossowski, L. (2006). A region in urokinase plasminogen receptor domain III controlling a functional association with $\alpha 5\beta 1$ integrin and tumor growth. *J Biol Chem* 281, 14852–14863.

Chung, A.S., and Ferrara, N. (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 563–584.

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

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

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

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

Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., and Martínez de la Escalera, G. (2015). Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol* 846, 83–95.

Collo, G., and Pepper, M.S. (1999). Endothelial cell integrin $\alpha 5\beta 1$ expression is modulated by cytokines and during migration in vitro. *J Cell Sci* 112, 569-578.

Comoglio, P.M., Boccaccio, C., and Trusolino, L. (2003). Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol* 15, 565–571.

Corbacho, A., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Duenas, Z., Noris, G., Morales, M., Martínez De La Escalera, G., and Clapp, C. (2000). Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocr* 166, 53–62.

Cruz-Soto, M.E., Cosío, G., Jeziorski, M.C., Vargas-Barroso, V., Aguilar, M.B., Cárabez, A., Berger, P., Saftig, P., Arnold, E., Thebault, S., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2009). Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipophyseal vasoinhibins: Cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology* 150, 5446–5454.

Damiano, L., Stewart, K.M., Cohet, N., Mouw, J.K., Lakins, J.N., Debnath, J., Reisman, D., Nickerson, J.A., Imbalzano, A.N., and Weaver, V.M. (2014). Oncogenic targeting of BRM drives malignancy through C/EBP β -dependent induction of $\alpha 5$ integrin. *Oncogene* 33, 2441–2453.

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

Del Rosso, M. (2011). uPAR in angiogenesis regulation. *Blood* 117, 3941–3943.

Duenas, Z., Rivera, J.C., Quiróz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., de Oca, P.M., López-Barrera, F., Nava, G., Guerrero, J.L., Suarez, A., De Regil, M., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2004). Prolactin in eyes of patients with retinopathy of

prematurity: Implications for vascular regression. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 45, 2049-2055.

Duenas, Z., Torner, L., Corbacho, A.M., Ochoa, A., Gutierrez, G., Lopez, F., Barrios, F.A., and Berger, P. (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 40, 2498-2505.

Fässler, R., and Meyer, M. (1995). Consequences of lack of $\beta 1$ integrin gene expression in mice. *Genes & Development* 9, 1896-1908.

Felcht, M., Luck, R., Schering, A., Seidel, P., Srivastava, K., Hu, J., Bartol, A., Kienast, Y., Vettel, C., Loos, E.K., Kutschera, S., Bartels, S., Appak, S., Besemfelder, E., Terhardt, D., Chavakis, E., Wieland, T., Klein, C., Thomas, M., Uemura, A., Goerdts, S., and Augustin, H. G. (2012). Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest* 122, 1991–2005.

Ferrara, N., and Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967–974.

Forsyth, C.B., Pulai, J., and Loeser, R.F. (2002). Fibronectin fragments and blocking antibodies to $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheum* 46, 2368–2376.

Francis, S.E., Goh, K.L., Hodivala-Dilke, K., Bader, B.L., Stark, M., Davidson, D., and Hynes, R.O. (2002). Central roles of $\alpha 5\beta 1$ integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *ATVB* 22, 927–933.

Galfione, M., Luo, W., Kim, J., Hawke, D., Kobayashi, R., Clapp, C., Yu-Lee, L.-Y., and Lin, S.-H. (2003). Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expression and Purification* 28, 252–258. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00639-3](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00639-3).

García, C., Aranda, J., Arnold, E., Thébault, S., Macotela, Y., López-Casillas, F., Mendoza, V., Quiroz-Mercado, H., Hernández-Montiel, H.L., Lin, S.-H., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2008). Vaso-inhibins prevent retinal vasopermeability

associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* JCI34508.

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

Herkenne, S., Paques, C., Nivelles, O., Lion, M., Bajou, K., Pollenus, T., Fontaine, M., Carmeliet, P., Martial, J.A., Nguyen, N.-Q.-N., *et al.* (2015). The interaction of uPAR with VEGFR2 promotes VEGF-induced angiogenesis. *Sci Signal* 8.

Hilfiker-Kleiner, D., Meyer, G.P., Schieffer, E., Goldmann, B., Podewski, E., Struman, I., Fischer, P., and Drexler, H. (2007). Recovery from postpartum cardiomyopathy in 2 patients by blocking prolactin release with bromocriptine. *J Am Coll Cardiol* 50, 2354–2355.

Huveneers, S., and Danen, E.H.J. (2009). Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 122, 1059–1069.

Huveneers, S., Truong, H., and Danen, E.H.J. (2007). Integrins: Signaling, disease, and therapy. *Int J Radiat Biol* 83, 743–751.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.

Kechagia, J.Z., Ivaska, J., and Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 457–473.

Kim, S., Bell, K., Mousa, S.A., and Varner, J.A. (2000). Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin $\alpha 5\beta 1$ with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 156, 1345-1362.

Kim, L., and Yamada, K. (1997). The regulation of expression of integrin receptors. *SEBM* 123-131.

Kinet, V., Nguyen, N.-Q.-N., Sabatel, C., Blacher, S., Noël, A., Martial, J.A., and Struman, I. (2009). Antiangiogenic liposomal gene therapy with 16K human prolactin efficiently reduces tumor growth. *Cancer Lett* 284, 222–228.

Klein, S., de Fougerolles, A.R., Blaikie, P., Khan, L., Pepe, A., Green, C.D., Kotliansky, V., and Giancotti, F.G. (2002). A5 β 1 integrin activates an NF- κ B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. *Mol Cell Biol* 22, 5912-5922.

Kugler, M., Wei, Y., and Chapman, H. (2003). Urokinase receptor and integrin interactions. *CPD* 9, 1565–1574.

Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J., and Weiner, R.I. (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: Activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* 139, 3696-3703.

Lee, S.-H., Kunz, J., Lin, S.-H., and Yu-Lee, L. (2007). 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res* 67, 11045–11053.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408.

Macotela, Y., Aguilar, M.B., Guzmán-Morales, J., Rivera, J.C., Zermeño, C., López-Barrera, F., Nava, G., Lavalle, C., de la Escalera, G.M., and Clapp, C. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* 119, 1790–1800.

Mettouchi, A., and Meneguzzi, G. (2006). Distinct roles of β 1 integrins during angiogenesis. *Eur J of Cell Biol* 85, 243–247.

Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J.K., and Giancotti, F.G. (2001). Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G1 phase of the cell cycle. *Mol Cell* 8, 115–127.

Morohoshi, K., Mochinaga, R., Watanabe, T., Nakajima, R., and Harigaya, T. (2018). 16 kDa vasoinhibin binds to integrin alpha5 beta1 on endothelial cells to induce apoptosis. *Endocr Connect* 7, 630–636.

Muether, P.S., Dell, S., Kociok, N., Zahn, G., Stragies, R., Vossmeier, D., and Jousen, A.M. (2007). The role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in the regulation of corneal neovascularization. *Exp Eye Res* 85, 356–365.

Nguyen, N.-Q.-N., Cornet, A., Blacher, S., Tabruyn, S.P., Foidart, J.-M., Noël, A., Martial, J.A., and Struman, I. (2007). Inhibition of tumor growth and metastasis establishment by adenovirus-mediated gene transfer delivery of the antiangiogenic factor 16K hPRL. *Mol Ther* 15, 2094–2100.

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

Orecchia, A., Mettouchi, A., Uva, P., Simon, G.C., Arcelli, D., Avitabile, S., Ragone, G., Meneguzzi, G., Pfenninger, K.H., Zambruno, G., and Failla, C. M. (2014). Endothelial cell adhesion to soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 triggers a cell dynamic and angiogenic phenotype. *FASEB* 28, 692-704.

Perimenis, P., Bouckenoghe, T., Delplanque, J., Moitrot, E., Eury, E., Lobbens, S., Gosset, P., Devisme, L., Duvillie, B., Abderrahmani, A., Storme, L., Fontaine, P., Froguel, P., and Vambergue, A. (2014). Placental antiangiogenic prolactin fragments are increased in human and rat maternal diabetes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1842, 1783–1793.

Qin, S., Li, A., Yi, M., Yu, S., Zhang, M., and Wu, K. (2019). Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol* 12, 27.

Rao, N., Lee, Y.F., and Ge, R. (2015). Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin* 36, 1177–1190.

Salic, A., and Mitchison, T.J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *PNAS* 105, 2415–2420.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671–675.

Senger, D.R., Ledbetter, S.R., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C.A., and Detmar, M. (1996). Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α 3 β 1 integrin, osteopontin and thrombin. *ASIP* 149, 293-305.

Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Streit, M., Kotliansky, V.E., de Fougères, A.R., and Detmar, M. (2002). The α 1 β 1 and α 2 β 1 integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 160, 195-204.

Serini, G., Napione, L., Arese, M., and Bussolino, F. (2008). Besides adhesion: new perspectives of integrin functions in angiogenesis. *Cardiovasc Res* 78, 213–222.

Short, S.M., Talbott, G.A., and Juliano, R.L. (1998). Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells. *MBoC* 9, 1969–1980.

Silva, R., D'Amico, G., Hodivala-Dilke, K.M., and Reynolds, L.E. (2008). Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1703–1713.

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

Sudhakar, A., Sugimoto, H., Yang, C., Lively, J., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2003). Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by α v β 3 and α 5 β 1 integrins. *PNAS* 100, 4766-4771.

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

Tabruyn, S.P., Sorlet, C.M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R.I., Martial, J.A., and Struman, I. (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-

dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of Nuclear Factor- κ B. *Mol Endocrinol* 17, 1815–1823.

Tarui, T., Andronicos, N., Czekay, R.-P., Mazar, A.P., Bdeir, K., Parry, G.C., Kuo, A., Loskutoff, D.J., Cines, D.B., and Takada, Y. (2003). Critical role of integrin $\alpha 5\beta 1$ in urokinase (uPA)/urokinase receptor (uPAR, CD87) signaling. *J Biol Chem* 278, 29863–29872.

Taverna, D., and Hynes, R.O. (2001). Reduced blood vessel formation and tumor growth in $\alpha 5$ -integrin-negative teratocarcinomas and embryoid bodies. *Cancer Res* 61, 5255-5261.

Teilum, K., Hoch, J.C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J.A., and Kragelund, B.B. (2005). Solution structure of human prolactin. *J Mol Biol* 351, 810–823.

Torner, L.M., Mejía, S., Jeziorski, M.C., Gonzalez, C., Morales, M.A., de la Escalera, G.M., and Clapp, C. (2003). Prolactin and 16K prolactin stimulate release of vasopressin by a direct effect on hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology* 20, 155–162.

Triebel, J., Bertsch, T., Bollheimer, C., Rios-Barrera, D., Pearce, C.F., Hufner, M., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2015). Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309, 1193-1203.

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

Triebel, J., Robles-Osorio, M. L., García-Franco, R., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., and Bertch, T. (2017). From bench to bedside: Translating the prolactin/vasoinhibin axis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 342.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203–212.

Umeda, N., Kachi, S., Akiyama, H., Zahn, G., Vossmeier, D., Stragies, R., and Campochiaro, P.A. (2006). Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an $\alpha 5\beta 1$ integrin antagonist. *Mol Pharmacol* 69, 1820–1828.

Wei, Y., Czekay, R.-P., Robillard, L., Kugler, M.C., Zhang, F., Kim, K.K., Xiong, J., Humphries, M.J., and Chapman, H.A. (2005). Regulation of $\alpha 5\beta 1$ integrin conformation and function by urokinase receptor binding. *J Cell Biol* 168, 501–511.

Xu, H., Zhao, G., Yang, J., and Wen, X. (2019). Advances in toxicity risk analysis and effective treatments for targeted antiangiogenic drugs. *Int J Clin Exp Med* 12, 12020–12027.

Zamora, M., Robles, J. P., Aguilar, B. M., Romero-Gómez, S. J., Bertsch, T., Martínez, G., Triebel, J., Clapp, C. (2021) Thrombin cleaves prolactin into a potent 5.6-kDa vasoinhibin: implication for tissue repair. *Endocrinology* 162, bqab177.

Zepeda-Romero, L.C., Vazquez-Membrillo, M., Adan-Castro, E., Gomez-Aguayo, F., Gutierrez-Padilla, J.A., Angulo-Castellanos, E., Barrera de Leon, J.C., Gonzalez-Bernal, C., Quezada-Chalita, M.A., Meza-Anguiano, A., Díaz-Lezama, N., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., and Clapp, C. (2017). Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 81, 473–479.