



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Miguel Concha M.
Instituto de Histología y Patología
Facultad de Medicina

Profesor Co-Patrocinante
Dr. Ignacio Moreno V.
Instituto de Química
Facultad de Ciencias

**CULTIVO DE ESFEROIDES DE CELULAS ENDOTELIALES
EA.hy926 EN MATRICES DE COLÁGENO: EVIDENCIAS DEL EFECTO
ANGIOGÉNICO DE CININAS.**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y al Título
profesional de *Bioquímico*

PAULA DANIELA SILVA VERA

VALDIVIA-CHILE

2005

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo está hecho, y ya sólo queda dejar constancia de todo lo que debo a tanta gente. Por otra parte, como no soy capaz de escribir nada original sobre agradecimientos, sólo intentaré transmitir mis sentimientos hacia todos los que han hecho posible que esté ahora terminando este trabajo

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron junto a mí en el término de mis estudios. Por supuesto, también debo este trabajo a mis padres Nelson y Berta (que espero hayan comprendido mi tardanza), a mis hermanos, a toda mi familia en general, que me han dado la oportunidad de descubrir lo que me gusta, y de dedicarme a ello.

A mi profesor patrocinante, el Dr. Miguel Concha por permitir desarrollar mi Tesis en su laboratorio, así como también por su constante supervisión, apoyo y disposición en el desarrollo de esta investigación.

Gracias también a la Dra. Alejandra Vidal y el Dr. Carlos Figueroa por sus ideas, buena voluntad y asesoramiento frente a cualquier duda. Agradezco también a mis compañeros Ángel, Carola, Francisca y Pamela por la ayuda en mi trabajo cuando la necesité y porque siempre mantuvieron un ambiente acogedor. A Don Genaro, que me ayudó en gran parte de los resultados obtenidos.

Finalmente y de forma especial agradezco de corazón a Guido, no sólo por su amor si no también por su paciencia. Qué puedo decir que sea nuevo para él. Simplemente te escribiré lo que ya te he dicho en otras palabras: “nadie hay para mi como tú”.

Esta Tesis fue financiada por el Proyecto DID-UACH S200411 del Dr. Miguel Concha.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Generalidades.	3
2.2 Angiogénesis.	3
2.3 Factores angiogénicos.	4
2.4 Objetivo general.	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 Cininas, antagonistas de cininas y factores de crecimiento.	10
3.2 Cultivo de células endoteliales humanas EA.hy926.	10
3.3 Preparación de esferoides multicelulares de células endoteliales EA.hy926.	11
3.4 Cultivo tridimensional de esferoides de células endoteliales EA.hy926 en matrices de colágeno tipo I.	11
3.5 Estimulación de los cultivos tridimensionales de esferoides de células endoteliales EA.hy926.	12
3.6 Análisis morfométrico de los esferoides de células endoteliales EA.hy926.	13
3.7 Marcaje de los esferoides de células endoteliales EA.hy926 con BrdU.	13
3.8 Histología e inmunocitoquímica.	13
3.9 Estadística.	14

4. RESULTADOS	15
4.1 Producción y cultivo de esferoides de CE EA.hy926 en matrices de colágeno tipo I.	15
4.2 Efecto de las cininas sobre la inducción de yemas y tubos en esferoides multicelulares de CE.	19
4.3 Evidencias morfológicas de la inducción de tubos endotelizados, con lumen, en esferoides de CE tratados con cininas.	29
5. DISCUSIÓN	35
5.1 Producción de esferoides multicelulares de CE EA.hy926.	35
5.2 Efecto angiogénico de las cininas.	38
5.3 Regulación del mecanismo angiogénico de cininas.	40
6. LITERATURA CITADA	43
7. ANEXOS	52
7.1 Preparación de solución stock de metilcelulosa.	52
7.2 Aislamiento y preparación de solución stock de colágeno tipo I.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINAS
Fig 1 Organización del sistema vascular desde la embriogénesis.	8
Fig 2 Componentes del sistema calicreínas-cininas.	9
Fig 3 Producción de esferoides multicelulares de CE.	16
Fig 4 Apariencia morfológica de esferoides multicelulares de CE EA.hy926 en matrices de colágeno tipo I.	17
Fig 5 Análisis cuantitativo de angiogénesis en esferoides multicelulares de CE EA.hy926.	20
Fig 6 Efecto angiogénico de LBK en esferoides de células EA.hy926.	22
Fig 7 BK pero no LDBK induce la angiogénesis en esferoides multicelulares de CE EA.hy926 y este efecto es dependiente de receptores específicos de cininas.	24
Fig 8 LBK y BK poseen diferente capacidad moduladora de la angiogénesis en esferoides multicelulares de CE EA.hy926.	27

Fig 9 IL-1 β potencia el efecto angiogénico BK y LDBK de sobre esferoides multicelulares de CE EA.hy926.	28
Fig 10 Apariencia morfológica y capacidad de proliferación en esferoides multicelulares de CE EA.hy926 tratados con LBK.	30
Fig 11 Inducción de yemas con lumen y capacidad proliferativa en esferoides de CE EA.hy926.	32
Fig 12 Estructura endotelizada ramificada de un esferoide en cultivos tratados con BK.	33
Fig 13 Ramificación tubular endotelizada y con lumen en un esferoide tratado con BK.	34

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla I Efecto de cininas y factores de crecimiento sobre la formación de yemas en esferoides multicelulares de CE EA.hy926 (μm^2).	21

ABREVIATURAS

ACE: Enzima convertidora de angiotensina II

AEC: 3-amino-9-etilcarbazol

AMPC: Adenosina monofosfato cíclico

ATB1: Antagonista para el receptor B₁, des-[Arg⁹]-Leu⁸ BK

ATB2: Antagonista para el receptor B₂, HOE-140

BK: Bradicinina

BrdU: 5-Bromo-2'-deoxi-uridina

BSA: Albúmina sérica bovina

CE: Células endoteliales

DBK: Des-[Arg⁹]-bradicinina

DMEM: Medio Eagle Dulbeco Modificado

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

eNOS: Óxido nítrico sintetasa endotelial

bFGF: Factor de crecimiento básico de fibroblastos

HAT: Hipoxantina-aminopterina-timidina

HOE140: D-Arg[Hyp³-Thi⁵-D-Tic⁷-Oic⁸]-bradicinina

IL-1: Interleuquina 1

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos

KO: Knock-Out

LBK: Lisina-bradicinina

LDBK: Lisina-des-[Arg⁹]-bradicinina

LPS: Lipopolisacárido

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.

MMP: Metaloproteasas de la matriz

NF- κ B: Factor nuclear- κ B

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

RNA: Ácido ribonucleico

SFB: Suero fetal de bovino

TNF: Factor de necrosis tumoral

TGF- α : Factor transformador del crecimiento- α

VEGF: Factor de crecimiento vascular-endotelial

1. RESUMEN

Las células endoteliales (CE) son un elemento celular central en la respuesta angiogénica. Recientes experimentos, realizados principalmente en animales, han sugerido que las cininas además de su función proinflamatoria poseerían actividad angiogénica. Para demostrar específicamente el efecto angiogénico de las cininas, en esta Tesis de Grado empleamos el cultivo de CE EA.hy926 humanas en matrices de colágeno. Con este propósito las CE fueron precultivadas como esferoides multicelulares en medio de cultivo DMEM-HAT-metilcelulosa. A continuación se cultivaron por 3 días en matrices de colágeno tipo I en presencia de bradicinina (BK), lisina-BK (LBK) y Lis-des-[Arg⁹]-BK (LDBK). Como controles se emplearon cultivos no estimulados o tratados con el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF). En algunos casos los esferoides fueron co-estimulados con interleuquina (IL)-1 β . Los esferoides fueron estudiados con microscopía de contraste de fase, fotografiados y la formación de yemas de CE cuantificada mediante el programa Image-Pro Plus 3.0. La proliferación celular se evaluó mediante incorporación de BrdU y el fenotipo endotelial fue controlado mediante revelado inmunohistoquímico del factor de von Willebrand. Adicionalmente, la apariencia tridimensional de las yemas y tubos endotelizados generados fue analizada en cortes histológicos seriados. Los resultados obtenidos demuestran que BK, LBK y LDBK inducen la respuesta angiogénica de las CE EA.hy926. Con el empleo de los antagonistas específicos HOE140 y ATB1 y de co-estimulación con IL-1 β , resultó evidente que el efecto de las cininas era mediado por receptores B₂ y de manera inducible, por receptores B₁. Nuestros resultados también subrayan que la producción de esferoides de CE y su cultivo en matrices de colágeno es un método altamente reproducible y angiogénicamente eficiente.

1.1 SUMMARY

The endothelial cell (EC) is a central factor in angiogenesis. Recent experiments, mainly in experimental animals, have suggested that kinins in addition to their pro-inflammatory function would have an angiogenic effect. In order to demonstrate this effect, in this Thesis we culture EA.hy926-human EC in collagen gels. With this purpose the EC were pre-cultured as multicellular spheroids in DMEM-HAT-methylcellulose culture medium. Then, spheroids were grown in type I collagen gels and stimulated with bradykinin (BK), lysil-BK (LBK) or Lys-des-[Arg9]-BK (LDBK) for a period of 3 days. Non stimulated cultures or cultures treated with the basic fibroblasts growth factor (bFGF) were used as control. In some cases the spheroids were also co-stimulated with interleukin (IL)-1 β . Then, the spheroids were *in situ* studied with phase contrast microscopy photographed and EC sprouting quantified by Image-Pro Plus 3.0 program. BrdU incorporation and von Willebrand factor both assayed by immunohistochemistry, let us evaluate cellular proliferation and monitored the endothelial phenotype, respectively. In addition, the three-dimensional appearance of the sprouting and endothelized tubes generated was analyzed in seriated histological sections. The results obtained in the present work demonstrate that the agonists BK, LBK and LDBK induce the angiogenic response of EC EA.hy926. The use of the specific antagonists HOE140 and ATB1 confirmed that the angiogenic effect is mediated by B₂ kinin receptors and by IL-1 β -inducible B₁ receptors. Our results also highlight that the production of EC spheroids and its culture in collagen gels is an angiogenic efficient, highly reproducible and low-cost method.

.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

La angiogénesis es esencial en el desarrollo de los procesos fisiológicos y el restablecimiento del flujo sanguíneo en los tejidos dañados. Por otra parte, la excesiva proliferación de vasos sanguíneos es característica de un sinnúmero de enfermedades que incluyen retinopatías, artritis, psoriasis y el crecimiento tumoral. Es por estas razones que la identificación de nuevos factores angiogénicos y antiangiogénicos podría tener valor terapéutico. Además, las matrices de proteínas poliméricas con actividad angiogénica podrían contribuir como herramientas significativas para el reemplazo de tejidos dañados y la curación de heridas extensas o de difícil curación.

2.2 Angiogénesis

La formación del sistema vascular depende de dos procesos, vasculogénesis (Flame y Risau, 1992; Flame y col, 1997; Beck y D`Amore, 1997) y angiogénesis (Folkman y Shing, 1992; Risau, 1997) [Fig. 1]. Es útil hacer una distinción entre estos dos conceptos. La vasculogénesis ocurre durante el desarrollo embrionario y se caracteriza por la formación de vasos sanguíneos de *novo* por diferenciación y ensamblaje de células precursoras mesodérmicas indiferenciadas, los angioblastos. Estos precursores de células endoteliales se unen y alinean formando cordones que desarrollan una cavidad interna dando lugar a una red de capilares primitivos que predominan tempranamente en el desarrollo embrionario. Por otra parte, la angiogénesis es un proceso celular finamente regulado que ocurre preferentemente en los individuos adultos, por el que vasos sanguíneos ya establecidos producen brotes que crecen y

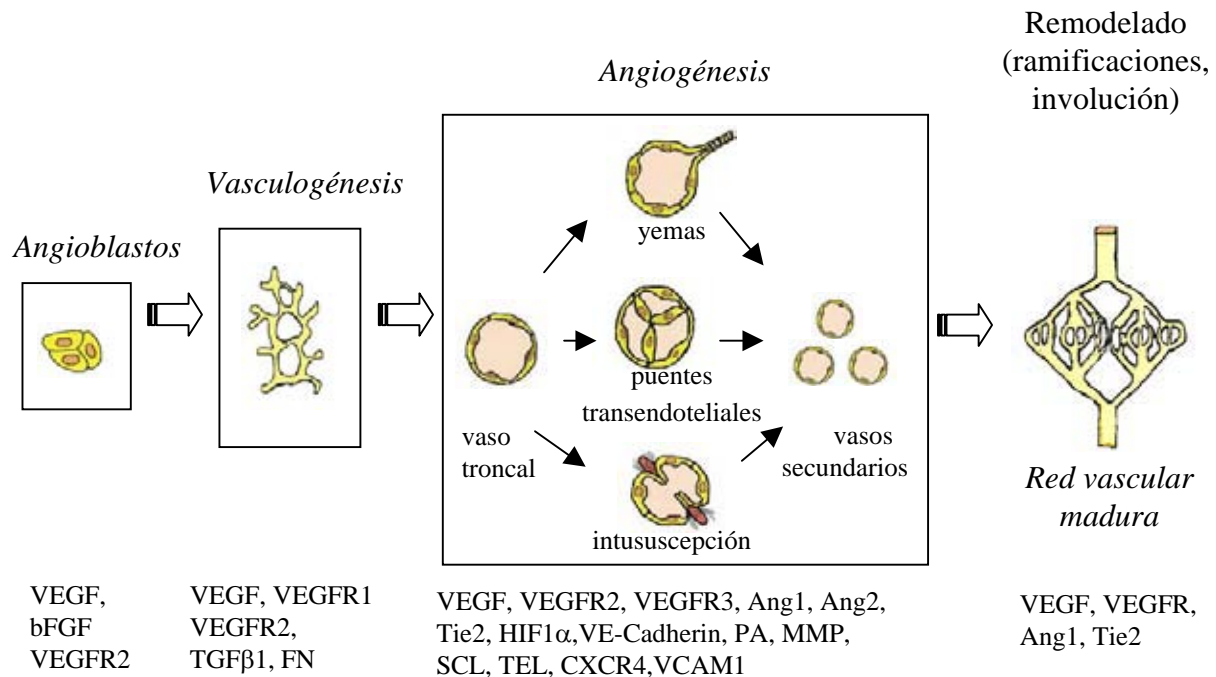


Fig 1 Organización del sistema vascular desde la embriogénesis. En el embrión, los precursores endoteliales o angioblastos se ensamblan en plexos primitivos (*vasculogénesis*) que se expanden y remodelan (*angiogénesis*) hasta alcanzar características maduras (reclutamiento de pericitos, producción de matriz extracelular y remodelado vascular), identidad vascular (formación de arterias, capilares, venas, etc) y la diferenciación organotípica (endotelios continuos, discontinuos, fenestrados, etc). No obstante el sentido que sigue la formación de los vasos sanguíneos, la injuria tisular produce ciclos de retorno a la angiogénesis, vasculogénesis o a la activación de células troncales vasculares. *Ang-1*, angiopietina-1; *Ang-2*, Angiopietina-2; *bFGF*, factor de crecimiento fibroblastos de básico; *CXCR4*: receptor 4 de quimiokina-CXC; *FN*, fibronectina; *HIF-1α*, factor inducible por hipoxia-1α; *MMP*, metaloproteasas de la matriz; *SCL*, célula troncal de la leucemia; *Tie2*, receptor para Ang-1; *TGF-β*, factor de transformación del crecimiento-β; *TEL*, ETS translocado en la leucemia; *VE-cadherin*, caderina vascular- endotelial; *VCAM-1*, molécula de adhesión intercelular vascular-1; *VEGF*, factor de crecimiento vascular endotelial; *VEGFR*, receptor VEGF. (Tomado de P. Carmeliet, *Nature Med.* 6: 389-395, 2000)

ramifican en los tejidos en respuesta a estímulos reparativos o de remodelado, dando lugar a la formación de una red capilar completamente establecida (Carmeliet, 2000; Jain, 2003; Augustin, 2001)

2.3 Factores angiogénicos

En la angiogénesis están involucrados diversos factores, entre ellos células, componentes de la matriz extracelular y moléculas solubles. La participación de estos tres tipos de factores puede ser mejor comprendida analizando el proceso de curación de la herida, donde la angiogénesis es esencial. Una vez restablecida la hemostasis sanguínea por formación de un coagulo de fibrina, la angiogénesis es iniciada por cambios en la morfología de las células endoteliales (CE), la pérdida de los medios de unión intercelular, vasodilatación y un incremento en la permeabilidad vascular. Este último fenómeno conduce a la extravasación de proteínas plasmáticas, principalmente fibrina y fibronectina. La liberación de estas proteínas permite la formación de una matriz extracelular provisional para la migración de las células endoteliales. Simultáneamente la degradación de la membrana basal endotelial por metaloproteasas de la matriz (MMP) facilita la migración de las CE. En estas condiciones las CE comienzan a ensamblarse formando brotes vasculares que adquieren lumen. La nueva formación de membrana basal permite reorganizar la unión endotelio-mesénquima, estableciéndose nuevamente la red vascular tridimensional. En los vasos del tipo de las arterias y venas el proceso se completa con el reclutamiento de pericitos y células musculares.

La desviación de los tejidos vasculares hacia un fenotipo angiogénico incluye un cambio en el equilibrio local entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos que favorece la sobreexpresión de uno o más reguladores positivos de la angiogénesis. Se han identificado diversos

factores que favorecen o inhiben la angiogénesis (Jain, 2003). Su inducción fue inicialmente atribuida a los factores de crecimiento básico y ácido de fibroblastos (bFGF y aFGF). Con posterioridad se ha observado que otras moléculas también poseen actividad angiogénica, entre ellas el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de transformación del crecimiento (TGF)- β , angiogenina, angiopoyetina-1, interleuquina (IL)-8, etc. Entre los factores que inhiben la angiogénesis se encuentran angiostatina, endostatina, angiopoyetina-2, interferón-alfa, IL-12, etc. Sin embargo, pareciera que la mayoría de estas moléculas inducen la angiogénesis estimulando la producción de bFGF y VEGF (Yancopoulos y col, 2000; Shibuya, 2001; Jain, 2003).

2.4 Objetivo General

En esta Tesis de Grado nos planteamos como objetivo general la producción *in vitro* de plexos vasculares en matrices poliméricas de colágeno y no menos importante, estudiar si en estas condiciones los símiles de vasos sanguíneos desarrollados responden a factores angiogénicos. Respecto a este último punto, nos interesó estudiar si las cininas poseen o no un efecto angiogénico. Las cininas corresponden a péptidos vasodilatadores de nueve o diez aminoácidos producidos por calicreínas (o cininogenasas) desde precursores llamados cininógenos (Fig 2). La unión de las cininas a receptores localizados en la superficie celular produce una variedad de efectos fisiológicos que incluyen vasodilatación, relajación y contracción de células musculares lisas y producción de dolor (Cassim y col, 2002). Dos receptores median el efecto de las cininas, B₁ y B₂. Ambos forman parte de la familia de los receptores de membrana acoplados a proteína G. Los receptores B₂ de cininas son constitutivos y tienen alta afinidad por bradicinina (BK) y lisina-bradicinina (LBK; también llamada calidina).

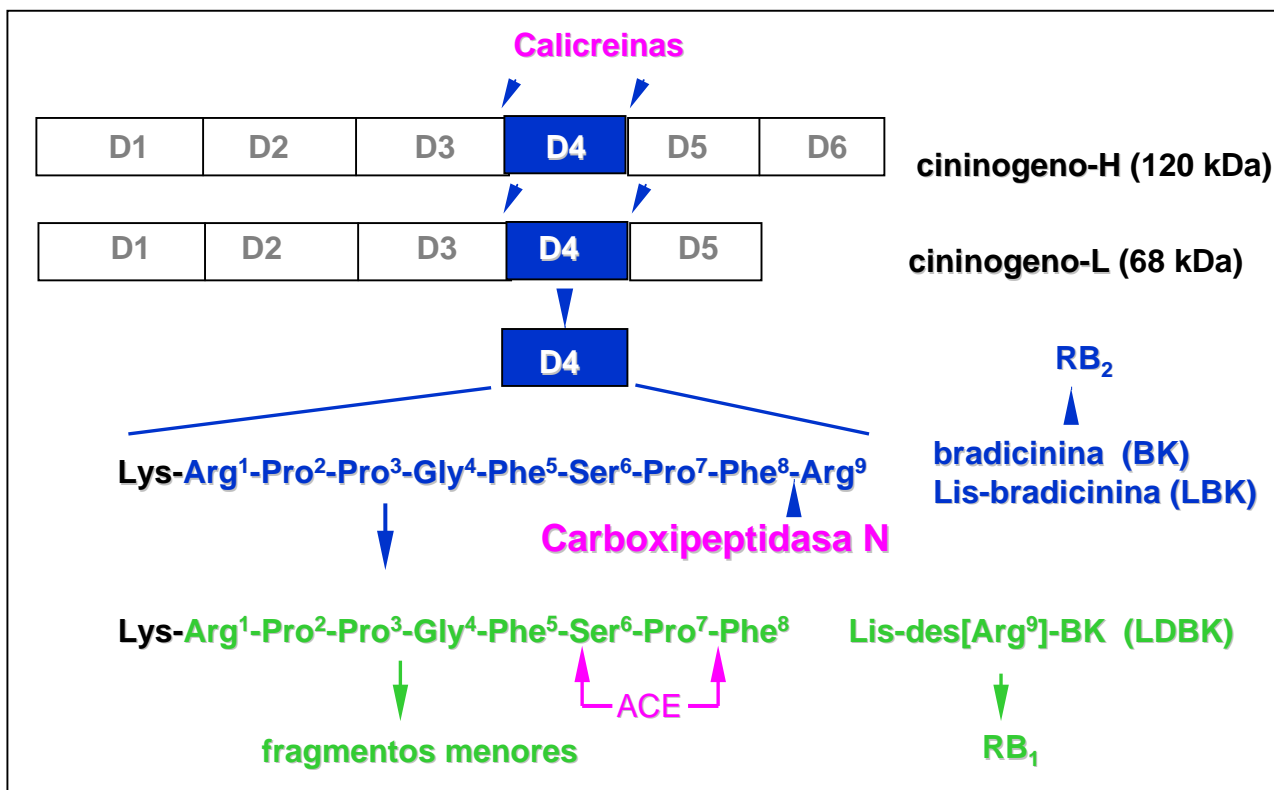


Fig 2 Componentes del sistema caliceínas-kininas Bradicininina (BK) y los péptidos relacionados lisina-bradicininina (LBK) y lisina-des-arginina-bradicininina (LDBK) se forman del cininógeno de alto (H) y bajo peso molecular (L) por acción de caliceínas plasmáticas y tisulares (*serinas proteasas*), que se activan por daño tisular, inflamación o anoxia. Las caliceínas tisulares producen LBK a partir del precursor de bajo peso molecular y las caliceínas plasmáticas liberan BK del precursor de alto peso molecular (D4, dominio 4 del precursor). Una arginina-carboxipeptidasa (cininasa I) actúa sobre el extremo carboxilo terminal de LBK y al remover el residuo arginina-9 produce LDBK. Otras enzimas como la cininasa II convertidora de angiotensina (ACE) hidroliza las cininas en péptidos menores que no está claro si son funcionales o no. Las cininas interactúan con receptores B₁ y B₂ (RB₁ y RB₂). El agonista BK se une específicamente al receptor B₂ mientras que LDBK actúa sobre receptores B₁. Reciente información indica que LBK se une a receptores B₂ y B₁.

En cambio, los receptores B₁ se unen a Des-[Arg⁹]-BK (DBK) y Lis-des-[Arg⁹]-BK (LDBK) y son inducidos por el estrés al calor, daño tisular e inflamación. La vida media de las cininas es muy corta, peptidasas (cininasas) que se encuentran en tejidos y sangre rápidamente las degradan a péptidos más pequeños. Evidencias crecientes demuestran que las cininas participarían en el crecimiento y migración de las células endoteliales (Morbidelli y col, 1998). Las cininas comparten importantes propiedades con VEGF, ambos factores incrementan la permeabilidad vascular, inducen vasodilatación y estimulan la liberación de óxido nítrico. A pesar de estas similitudes el posible efecto angiogénico de las cininas ha sido escasamente considerado (Bhoola y col, 1992; Ahluwalia y Perretti, 1999).

Para estudiar la posible función angiogénica de las cininas específicamente nos interesó:

- i)* poner en marcha un método que permita la producción de esferoides multicelulares de CE humanas para facilitar la supervivencia celular, la respuesta a factores de crecimiento y la angiogénesis. Para ello se empleó la línea de CE EA.hy926 de origen humano.
- ii)* Inducir la formación de plexos vasculares *in vitro* cultivando los esferoides de células EA.hy-926 en matrices de colágeno tipo I.
- iii)* Investigar la capacidad angiogénica de cininas sobre las CE EA.hy926. Para ello, los cultivos fueron estimulados con BK, LBK y LDBK y co-incubados con antagonistas específicos para los receptores B₂ y B₁, HOE140 y ATB1, respectivamente. Los cultivos también fueron pre-estimulados con IL-1 β , un inductor de la expresión del receptor B₁ (Zhou y col, 1998). Como controles se emplearon cultivos no estimulados y otros estimulados con bFGF. La inducción de la angiogénesis fue cuantificada mediante análisis de imagen de las yemas y tubos inducidos en los esferoides. La formación de estructuras vasculares tubulares endotelizadas y con lumen fue determinada en cortes histológicos seriados de este material,

previamente fijado e incluido de acuerdo a técnicas histológicas convencionales. Además, se analizó la proliferación de las células endoteliales mediante ensayo de incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). El fenotipo de las CE fue controlado por la expresión del factor de von Willebrand. Los resultados obtenidos revelaron que BK, LBK y LDBK inducen la respuesta angiogénica de las CE EA.hy926 y que el efecto de dichos agonistas sería mediado por receptores B_2 y de manera inducible, por receptores B_1 . Nuestros resultados también mostraron que la producción de esferoides de CE y su cultivo en matrices de colágeno corresponden a un método altamente reproducible y angiogénicamente eficiente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 *Cininas, antagonistas de cininas y factores de crecimiento*

Las cininas usadas fueron LBK (Sigma, Chemical Co., USA), BK (Bachem Inc., Torrance California) y LDBK (Sigma). Estas se prepararon a una concentración stock de 1,68, 1,6 y 1,7 mM, respectivamente, y todas fueron usadas a la concentración final de 100 nM. Los antagonistas para los receptores B₁ y B₂ de cininas, HOE140 (Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt, Alemania) y des-[Arg⁹]-Leu⁸ BK (ATB₁; Sigma) se prepararon a una concentración stock de 2 mM y 9 mM, respectivamente, y se utilizaron en exceso a concentraciones de 10 µM. El efecto de las cininas fue comparado con bFGF (Gibco, Invitrogen Corporation, USA). Interleuquina-1β [(IL-1β), Calbiochem, San Diego, California] fue usada a una concentración final de 1 ng/ml.

3.2 *Cultivo de células endoteliales humanas EA.hy926*

1x10⁶ células endoteliales (CE) humanas de la línea EA.hy926, gentilmente donadas por la Dra. CJS Edgell (Edgell y col, 1983), fueron cultivadas en botellas de 25 cm² con medio Eagle Dulbecco Modificado 1,8 mM Ca²⁺ (DMEM, Gibco) suplementado con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) [Gibco], 10% suero fetal de bovino (SFB; Gibco), 1% penicilina G - estreptomicina (Gibco), 1% Fungizona® (Gibco) y glutamina 200 mM (Sigma) a 37°C en atmósfera húmeda y 5% CO₂. Este medio de cultivo fue denominado DMEM-HAT. Las células confluentes (aproximadamente a los 3 días) fueron tratadas con tripsina 0,25% - EDTA 1mM por 3 min y recuperadas con lavados en medio Hanks-Solución Salina Balanceada-10% SFB. Las

células fueron contadas y la viabilidad determinada por exclusión de azul tripano. En cada experimento se utilizaron 5×10^5 células EA.hy926 para la preparación de los esferoides.

3.3 Preparación de esferoides multicelulares de células endoteliales EA.hy926

Con este objetivo se utilizó el método de Korff y Augustin (1998), extensamente descrito en Korff (2004). Brevemente, 5×10^5 células EA.hy926 fueron resuspendidas en 7,5 ml de una solución que contenía medio DMEM-HAT (80%) y metilcelulosa (20%) [4000 centipoises, N° Cat m-0512, Sigma]¹. De esta mezcla se sembraron 6 μ l por pocillo en microplacas no adherentes de 96 pocillos (MicrotestTM U-Bottom, Non-Tissue Culture Treated Plate, N° Cod. 35 1177, Becton Dickinson, USA). A continuación cada pocillo recibió 100 μ l de medio DMEM-HAT (80%) y metilcelulosa (20%) y las células fueron incubadas 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Bajo estas condiciones, en cada pocillo se formó un solo esferoide, de tamaño definido y número de células conocido, que en todos los casos correspondió a 400 células/esferoide.

3.4 Cultivo tridimensional de esferoides de células endoteliales EA.hy926 en matrices de colágeno

El colágeno tipo I fue obtenido de tendones de cola de rata de acuerdo al método de Schoop y col (1999)². El método empleado para la preparación de las matrices de colágeno polimérico corresponde al descrito por Maas-Szabowski y col (2002); su colonización con esferoides multicelulares de células endoteliales se encuentra en Korff y Augustin (1998). Brevemente, se mezclaron 8 vol. de colágeno tipo I (4 mg/ml) con 1 vol de Hanks 10X que

¹ Ver Anexo (7.1)

² Ver Anexo (7.2)

contenía Ca^{2+} , Mg^{2+} y rojo fenol como indicador de pH. Después de ajustar a pH 7,4 con NaOH 2 N, se agregó 1 vol de SFB. Luego de esto, se procedió a recolectar en 2 tubos de cultivo de 50 ml 960 esferoides (producidos en 10 microplacas). Para su recolección se empleó una punta azul de 1 ml con el extremo cortado para evitar desarmar los esferoides. Éstos fueron centrifugados a 400 g por 3 minutos. El sobrenadante fue desechado, los esferoides se resuspendieron con 2,5 ml de solución stock de metilcelulosa (que contenía 20% de SFB) y se agregaron 2,5 ml de solución de colágeno equilibrado. Un ml de esta mezcla fue sembrada por pocillo en placas NunclonTM Δ Multi-Dishes (Nº Cod. 176740, 4 Well Round Plate, NUNC Brand Products, Denmark). De esta manera cada matriz contenía aproximadamente 200 esferoides. Para favorecer la gelificación de las matrices, éstas se incubaron en estufa a 37°C por 1 hr. A continuación las matrices recibieron medio DMEM-HAT y fueron estimuladas como se indica más adelante. Toda la preparación de las matrices de colágeno y la mezcla con los esferoides de células endoteliales se realizó en frío para evitar la agregación anticipada del colágeno.

3.5 Estimulación de los cultivos tridimensionales de esferoides de células endoteliales EA.hy926

Los cultivos fueron estimulados con BK, LBK y LDBK cada 24 hrs, durante tres días. En cada estimulación, los cultivos recibieron los agonistas y luego de dos horas de difusión se agregó medio DMEM-HAT para alcanzar la dilución final de uso de los agonistas. También se efectuaron ensayos con los antagonistas específicos para el receptor B_2 HOE140 y receptor B_1 ATB₁. Los antagonistas se dejaron difundir por dos horas para luego agregar la cinina en estudio. Como control de angiogénesis se utilizó estimulación con bFGF 5 ng/ ml. Además se hicieron

controles sin estimulación. Este mismo procedimiento fue utilizado para ensayar el efecto de IL-1 β sobre los receptores B₁.

3.6 Análisis morfométrico de los esferoides de células endoteliales EA.hy926

Los cultivos estimulados con *i*) cininas, en ausencia o presencia de antagonistas, *ii*) los controles tratados con bFGF o aquellos no estimulados, y *iii*) los cultivos tratados con IL-1 β fueron estudiados con un microscopio de contraste de fase (Olympus CKX41) durante todo el periodo de cultivo. Justo antes de la cosecha (al día 3), se seleccionaron 10 esferoides representativos de cada experimento, los que fueron fotografiados con una cámara digital Olympus C-5050 ZOOM y las imágenes procesadas y cuantificadas con el programa de análisis de imagen Image-Pro Plus 3.0. Con este sistema se midieron las yemas y tubos producidos por cada esferoide, expresándose como área acumulada de yemaciones (μm^2).

3.7 Marcaje de los esferoides de células endoteliales EA.hy926 con BrdU

Los cultivos recibieron a las 24 y 48 hrs un pulso de 5-bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU; Sigma) a una concentración final de 100 μM . Las células que incorporaron BrdU fueron identificadas mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos de este material.

3.8 Histología e inmunohistoquímica

Las matrices fueron cosechadas al día tres y divididas en dos mitades. Una de ellas fue incluida en medio Cryomatrix (Thermo Shandon, USA), congeladas en la fase gaseosa de nitrógeno líquido y conservadas hasta su uso a -80°C . La otra mitad fue fijada por 48 hrs en

líquido de Bouin e incluida en parafina. Se efectuaron cortes histológicos teñidos con H-E. También se efectuaron cortes histológicos seriados de experimentos representativos.

El revelado de BrdU se efectuó mediante el método inmunohistoquímico de la biotina-streptoavidina-peroxidasa. Luego de desparafinar y bloquear los cortes histológicos con H₂O₂ 0,3% en metanol, estos fueron consecutivamente incubados con anticuerpo monoclonal anti – BrdU (mAb G3G4; Developmental Studies Hybridoma Bank, Baltimore, MD) [diluido 1:100 en PBS-0,5 % BSA], segundo anticuerpo conjugado a biotina (DAKO LSAB®+ System, DAKO, USA), estreptavidina conjugada a peroxidasa (DAKO LSAB®+ System), y revelados con 3-amino-9-etilcarbazol (AEC Substrate System, DAKO). Este mismo procedimiento fue empleado para revelar el antígeno factor de von Willebrand con un anticuerpo policlonal específico (DAKO; 1:100 en PBS-0,5 % BSA). En este último caso, se empleó como cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Como control inmunohistoquímico, se utilizaron incubaciones sin primer anticuerpo. Los preparados fueron contrastados con hematoxilina y montados en medio acuoso Mowiol (Polysciences, USA).

3.9 Estadística

Se efectuaron tres experimentos independientes por cada tratamiento, estudiándose aproximadamente 30 esferoides por tratamiento. El área acumulada de 5 y 15 yemas y tubos por esferoide fue analizada con el programa *Sigma Plot 8.0*. Los resultados fueron expresados como el promedio del área acumulada de yemas (μm^2) \pm error estándar y estudiada con un test *t* de Student no pareado, considerándose significativo un valor de $p < 0,05$ (*) y altamente significativo un valor de $p < 0,005$ (**).

4. RESULTADOS

4.1 Producción y cultivo de esferoides de CE EA.hy926 en matrices de colágeno tipo I

El empleo del método desarrollado por Korff y Augustin (1998) permitió generar en placas de 96 micropocillos (no tratadas para cultivo celular) un solo esferoide por pocillo, constituido aproximadamente por 400 células (Fig 3). Luego de ser cosechados, los esferoides fueron embebidos en colágeno tipo I y metilcelulosa 20%. Luego de 1 hr de gelificación de la matriz los esferoides no sufrieron alteraciones en su forma. Con periodos de cultivo de 1-3 días y bajo la influencia de factores estimuladores como cininas y los factores de crecimiento bFGF e IL-1 β , los esferoides generaron yemas de células endoteliales, las más desarrolladas de las cuales adquirieron la apariencia de tubos (Fig 4c-f, flechas). En los esferoides más próximos al fondo de la placa de cultivo no ocurrió formación de yemas y tubos sino el desarrollo de monocapas de CE que produjeron la conexión entre los esferoides (Fig 4g y h, asterisco). Estos esferoides (“esferoides que caminan”) no fueron considerados para la cuantificación de angiogénesis. Tampoco fueron consideradas las células endoteliales que de manera aislada se irradiaban desde la superficie de los esferoides.

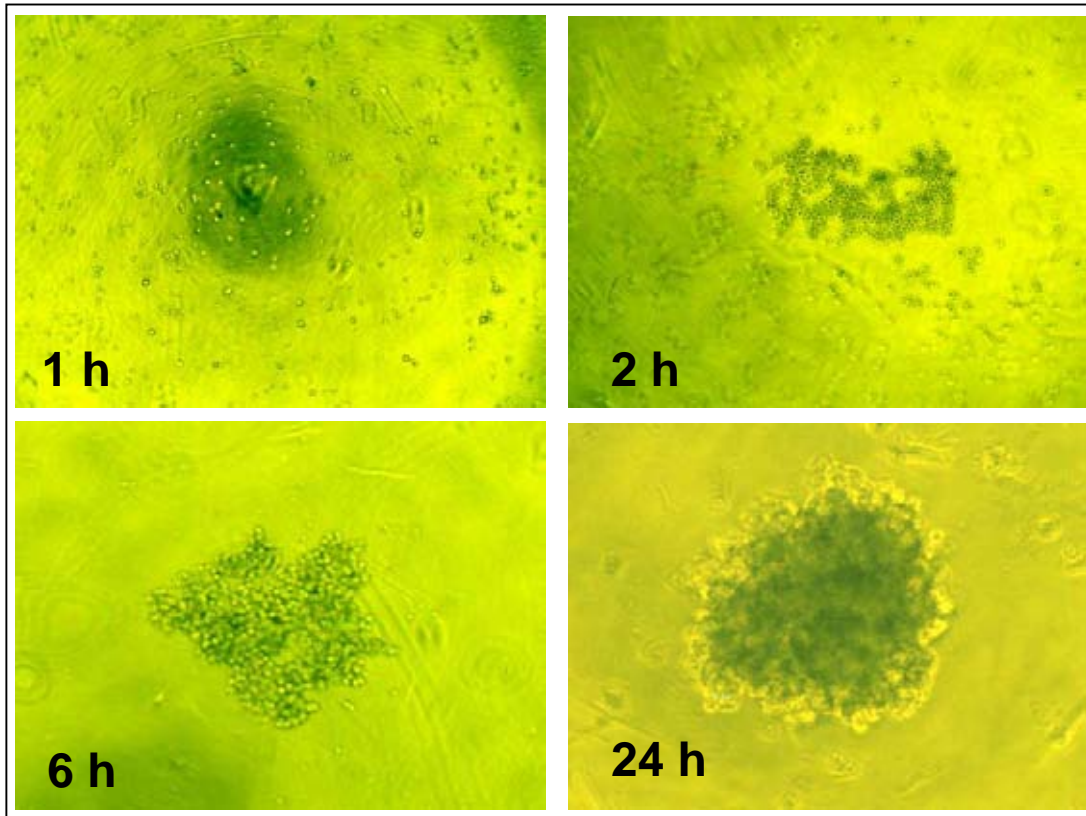


Fig 3 *Producción de esferoides multicelulares de CE.* La figura muestra la progresiva agregación de CE humanas de la línea EA.hy926 que ocurre cuando éstas se cultivan con medio de cultivo que contiene 20% metilcelulosa. El uso de placas de cultivo no adherentes resultó esencial para la formación de los esferoides multicelulares. Luego de 24 hr de incubación se observa la formación de un solo esferoide por pocillo y la ausencia de células aisladas o libres. (Microscopía de contraste de fase, X100).

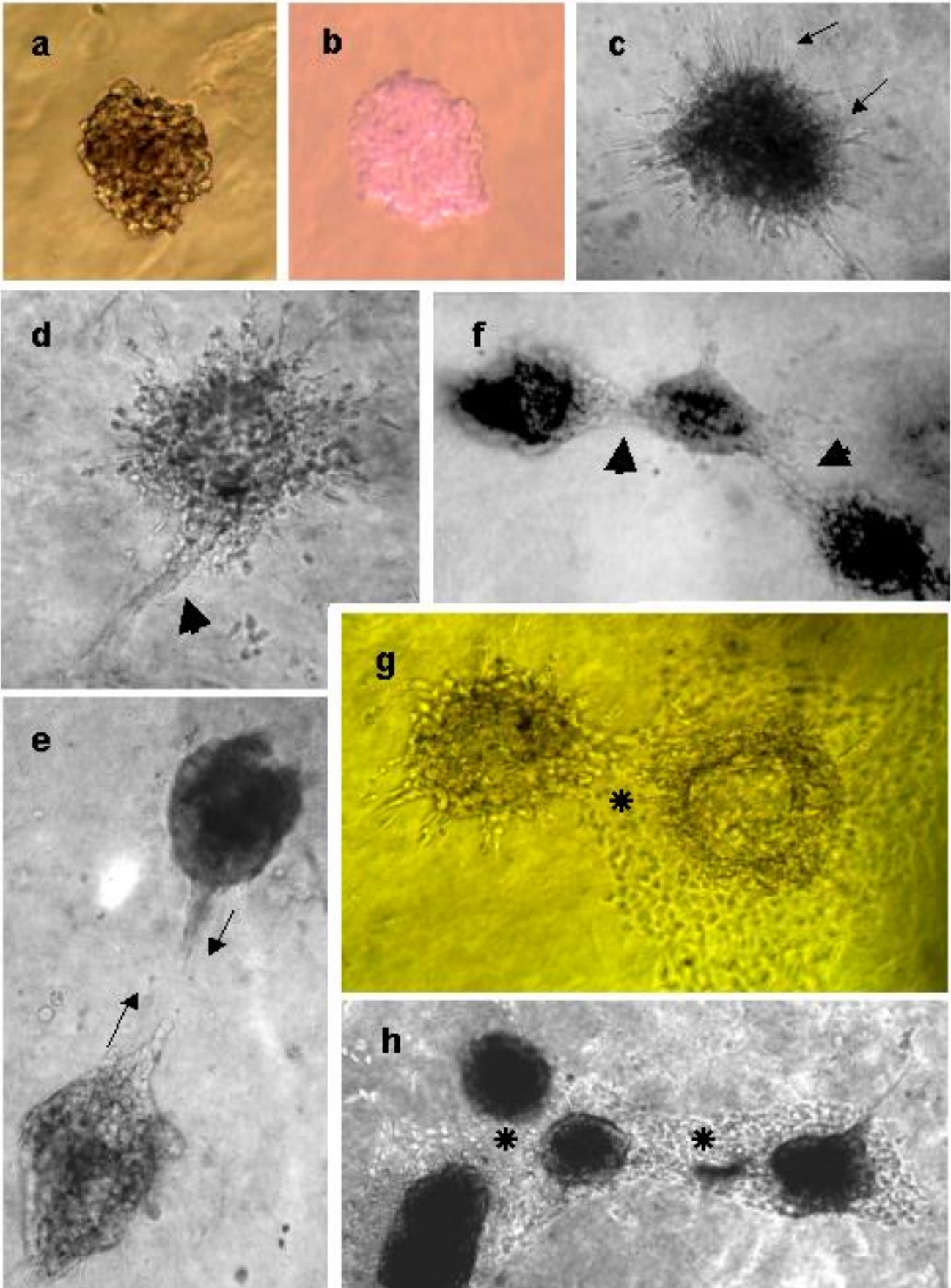


Fig 4 *Apariencia morfológica de esferoides multicelulares de CE EA.hy926 en matrices de colágeno tipo I* En (a y b) se pueden observar esferoides luego de 1 hr de gelificación de la matriz de colágeno. En esta última, los esferoides no pierden su forma redondeada (b). Sin embargo, con el tratamiento con factores estimuladores se forman en la superficie de los esferoides yemas de CE representativas de angiogénesis (c, flechas). (d) Algunas yemas adquieren apariencia de tubos (flecha) que se dirigen simultáneamente desde un esferoide a otro produciendo conexiones directas entre estos (e y f). En cambio, las células endoteliales de aquellos esferoides que durante la gelificación de la matriz quedan más próximos al fondo de la placa de cultivo, migran en monocapa sin formar tubos de conexión (g y h). (a y b) Esferoides no estimulados; (c) LBK 10 nM; (d y e) BK 100 nM; (f y h) LBK 100 nM; (g) bFGF 5 ng/ml.(a-g, X100)

4.2. Efecto de las cininas sobre la inducción de yemas y tubos en esferoides multicelulares de CE

La cuantificación del área acumulada de yemas y tubos en μm^2 (promedio \pm error estándar) con el programa Image-Pro Plus 3.0 (Fig 5) permitió comprobar que LBK inducía una respuesta angiogénica dosis-dependiente (Tabla I, Fig 6). Mientras que en los cultivos no tratados y aquellos tratados con LBK 1 nM los esferoides se mostraron poco activos, con concentraciones de LBK 10 nM y especialmente LBK 100 nM ($7252,7 \pm 360,0$) se produjo la formación de yemas y tubos desde la superficie de los esferoides. Tanto con dosis de LBK de 10 y 100 nM se desarrollaron tubos de conexión entre los esferoides (Fig 6a). De manera similar a LBK, BK a concentraciones 100 nM también indujo la formación de yemas pero con menor intensidad ($5235,8 \pm 289,2$). Comparativamente, los cultivos tratados con LDBK no tuvieron un efecto perceptible ($2837,3 \pm 168,0$) sobre aquellos sin estimulación ($2475,6 \pm 227,6$).

Para conocer cuál de los receptores para cininas -B₁ o B₂- estaba implicado en la acción angiogénica observada en estos resultados, se efectuaron a continuación ensayos de co-incubación de BK, LBK y LDBK (100 nM) con un exceso de los antagonistas Des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (ATB1) específico para el receptor B1; y HOE140 (ATB2), específico para el receptor B2. En ambos casos los antagonistas fueron empleados a una concentración de 10^{-6} M. Como control positivo, en estos experimentos se empleó el factor de crecimiento bFGF (5 ng/ml). Como muestra la Tabla I, en presencia del antagonista HOE140 ocurrió una notoria disminución en la formación de yemas y tubos. En el caso de BK la inhibición fue próxima a valores basales (Tabla I, Fig 7a); para LBK la inhibición fue aproximadamente 33 % (Tabla I) y en el caso de LDBK,

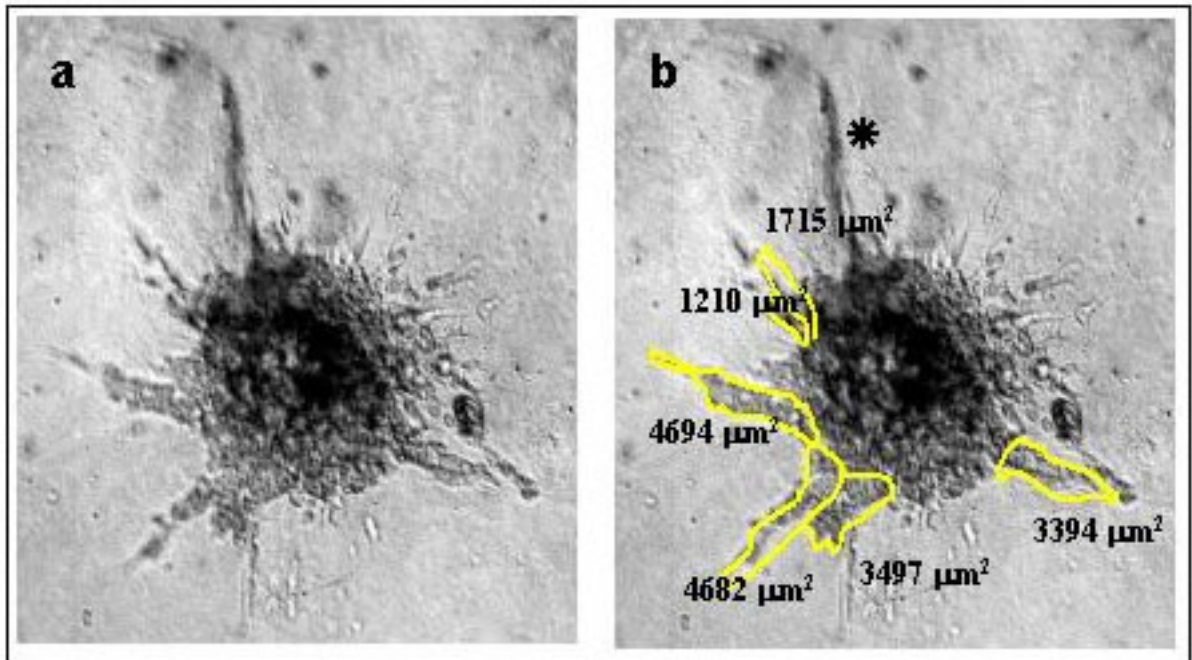


Fig 5 *Análisis cuantitativo de angiogénesis en esferoides multicelulares de CE EA.hy926* (a) Imagen de contraste de fase de un esferoide embebido en matriz de colágeno tipo I estimulado con BK 100 nM durante tres días. (b) Cuantificación del área de las yemas delineadas en amarillo (μm^2) con el programa de análisis de imagen Image-Pro Plus 3.0. Con el asterisco se ha marcado una condensación de fibras de colágeno que semeja una prolongación de células endoteliales.(a y b, X200)

Tabla I Efecto de cininas y factores de crecimiento sobre la formación de yemas en esferoides multicelulares de CE EA.hy926 (μm^2)

		HOE-140 ⁽¹⁾	ATB1 ⁽²⁾
BK	5235,8 ± 289,2** ⁽³⁾	2280,1 ± 242,1	3853,5 ± 242,1
LBK	7252,7 ± 360,0**	4804,2 ± 830,5	6064,5 ± 1532,1
LDBK	2837,3 ± 168,0	2925,1 ± 158,2	2356,0 ± 210,7
s/estímulo	2475,6 ± 124,8	N/R	N/R
bFGF	4646,9 ± 227,6**	N/R	N/R

IL-1β	IL-1β + BK	IL-1β + LDBK
6.665,6 ± 429,2	10.473,9 ± 780,9 ^{@@}	11.687,9 ± 1035,7 ^{@@}

⁽¹⁾ Antagonista receptores B2 de cininas.

⁽²⁾ Antagonista receptores B1 de cininas.

⁽³⁾ Los datos corresponden al promedio ± error estándar del área acumulada (μm^2) de las yemas y tubos inducidos en tres experimentos independientes, por tratamiento.

** $p < 0.005$ vs. s/estímulo

@@ $p < 0.005$ vs IL-1 β

N/R, no realizado

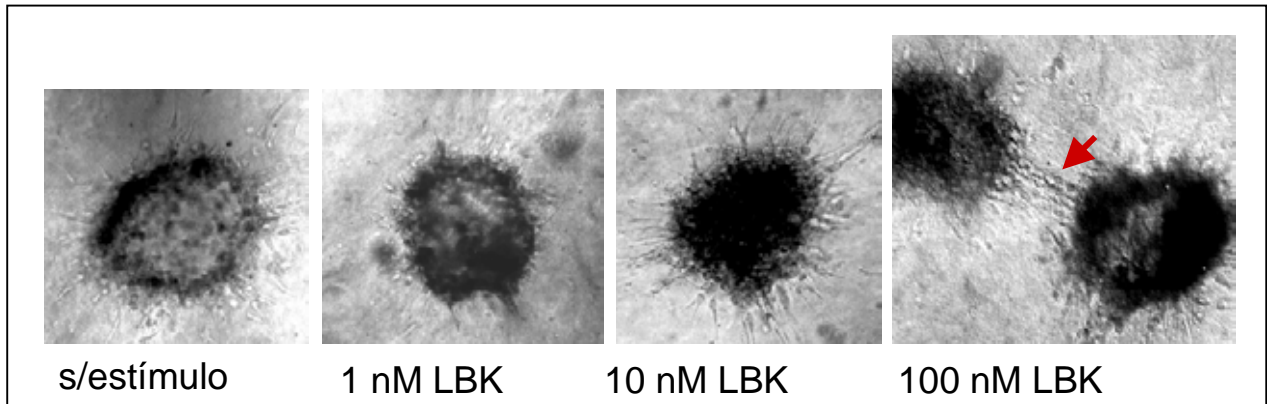
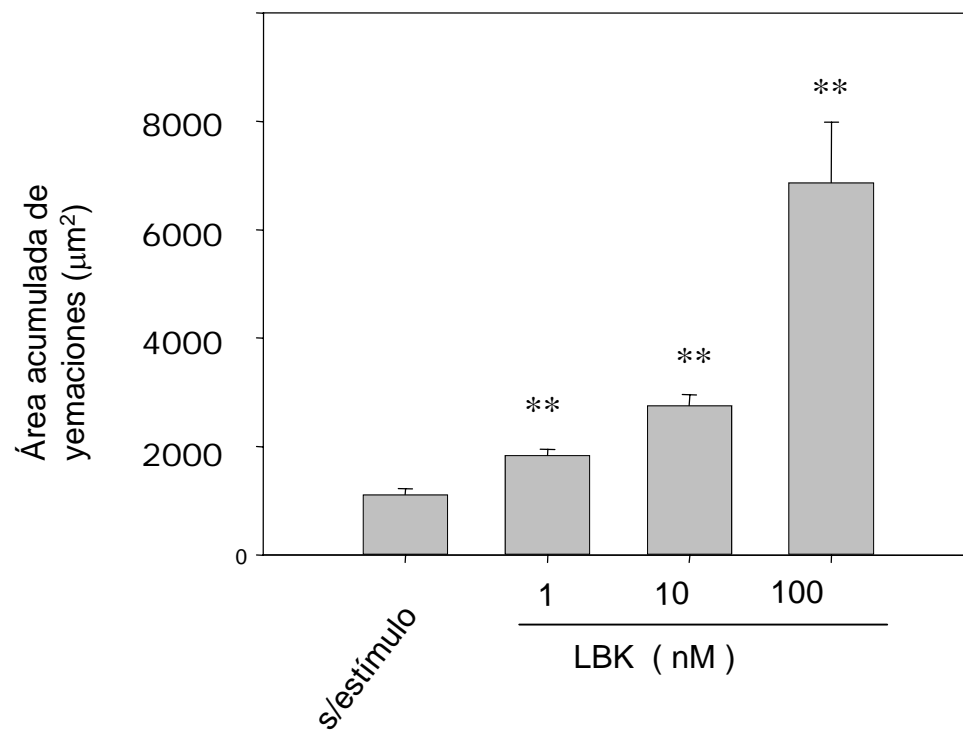
a**b**

Fig 6 Efecto angiogénico de LBK en esferoides de células EA.hy926 (a)

Producción de yemas de CE en esferoides cultivados tres días en matrices de colágeno tipo I con diferentes concentraciones de LBK o en ausencia de cininas. Se puede observar la superficie lisa de los esferoides no estimulados. A concentraciones de LBK de 10 y 100 nM las yemas formaron tubos de conexión entre esferoides (*flecha*). (b) Análisis cuantitativo de las yemas formadas en esferoides de células endoteliales EA.hy926, estimulados o no con LBK. (a, microscopía de contraste de fase, X100). [$**p < 0.005$ vs s/estimulación]

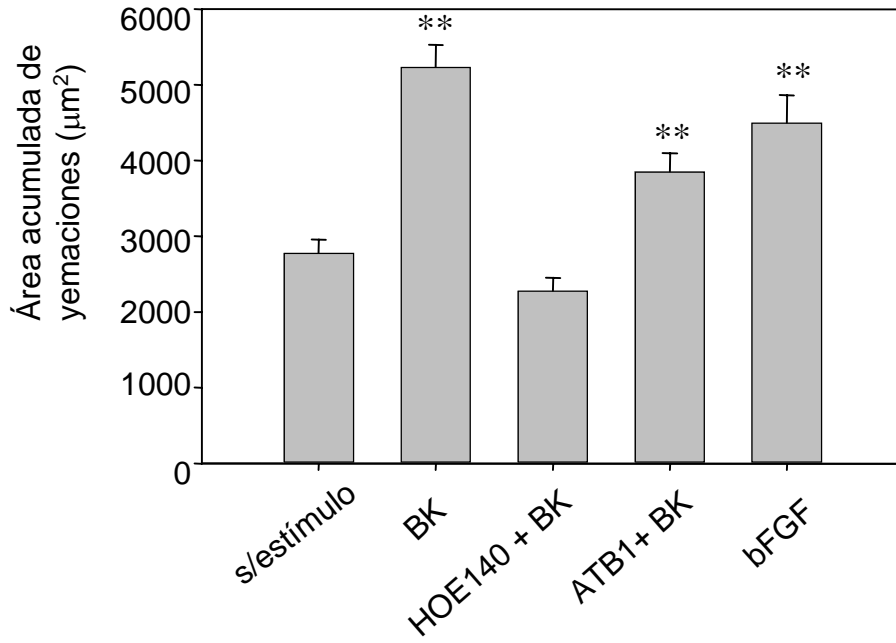
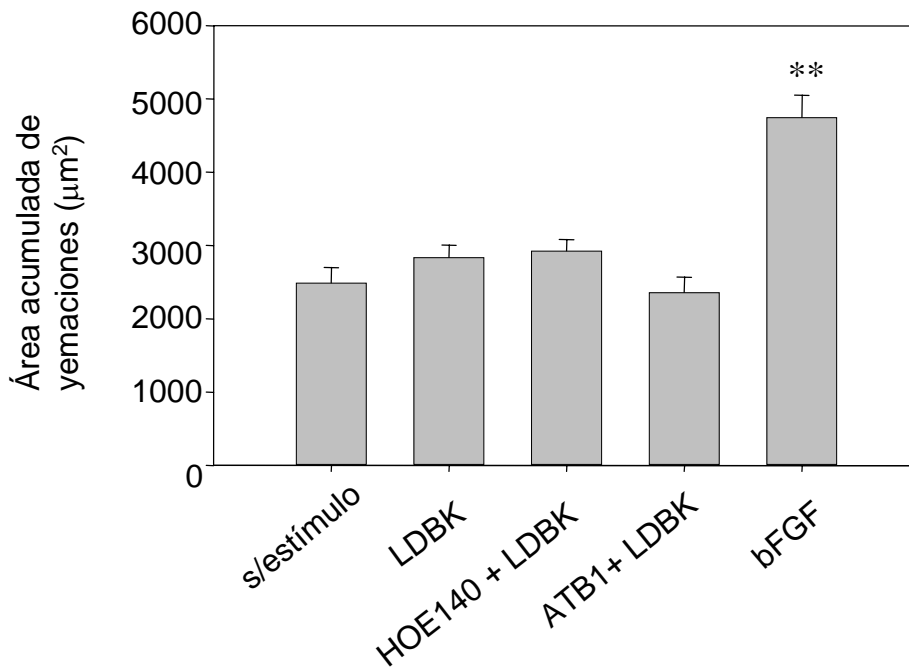
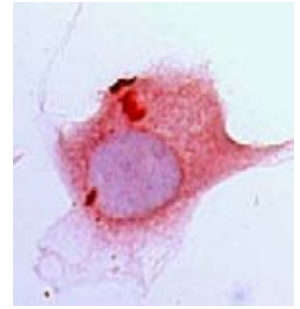
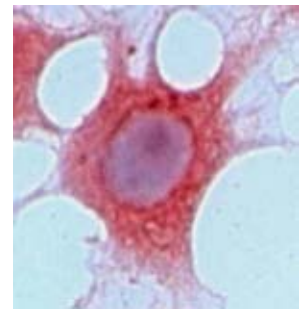
a**b****c**receptor B₂receptor B₁

Fig 7 *BK pero no LDBK induce la angiogénesis en esferoides multicelulares de CE EA.hy926 y este efecto es dependiente de receptores específicos de cininas* (a)

La estimulación de esferoides de CE con BK 100 nM durante tres días en matrices de colágeno tipo I indujo eficientemente la formación de yemas de CE en un rango comparable con el factor angiogénico bFGF (5 ng/ml). Cuando la estimulación con BK se realizó en presencia del antagonista específico para el receptor B₂ (HOE140) ocurrió una completa inhibición del efecto de BK sobre la formación de las yemas. Este efecto fue menos evidente con coincubación con el antagonista del receptor B₁ (ATB1). (b) La estimulación de esferoides con LDBK 100 nM por tres días no tuvo efecto inductor de la angiogénesis. (c) Inmunoreactividad para el receptor B₂ y B₁ en CE EA.hy926. (c, método de la estreptoavidina-biotina-peroxidasa y tinción de contraste hematoxilina, X460) [****** $p < 0.005$ vs. s/estimulación]

HOE140 no tuvo efecto (Tabla I, Fig 7b). Con el empleo del antagonista ATB1 la inhibición de yemas y tubos fue notoriamente menor (Tabla I, Fig 7).

A concentraciones 100 nM, LDBK produjo el mayor efecto, BK tuvo un efecto intermedio, y éste fue imperceptible para LDBK comparado con los controles no estimulados (Tabla I, Figs 7 y 8). La acción angiogénica de BK fue similar a la del factor bFGF, utilizado a concentraciones de 5 ng/ml (290 nM).

Estos resultados sugirieron fuertemente que los receptores B₂ estaban implicados en la respuesta angiogénica observada para cininas. Para comprobar si los receptores B₁ tenían o no una participación, los cultivos fueron coincubados con IL-1 β (1 ng/ml) y BK o LDBK (100 nM). Bajo estas condiciones, LDBK aumentó aproximadamente 4 veces su capacidad de inducción de yemas y tubos ($11687,9 \pm 1035,7$; Tabla I, Fig 9). En el caso de BK el efecto fue similar a la suma del efecto aislado de BK y de IL-1 β ($10473,9 \pm 780,9$; Tabla I, Fig 9).

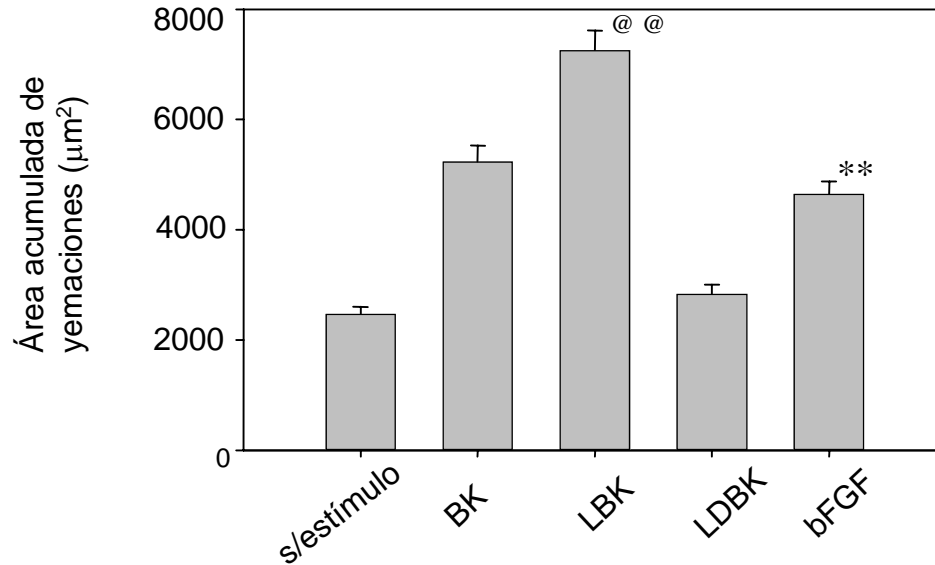


Fig 8 *LBK y BK poseen diferente capacidad moduladora de la angiogénesis en esferoides multicelulares de CE EA.hy926* La comparación del efecto de BK, LBK y LDBK 100 nM sobre la inducción de yemas y tubos en esferoides de CE, demostró que LBK era más eficiente que BK mientras que LDBK no tenía efecto perceptible. En las condiciones experimentales empleadas y en una comparación en una base molar LBK fue aún más eficiente que bFGF (290 nM) en la inducción de yemas.

(@@ $p < 0.005$ vs BK; ** $p < 0.005$ vs s/estimulación)

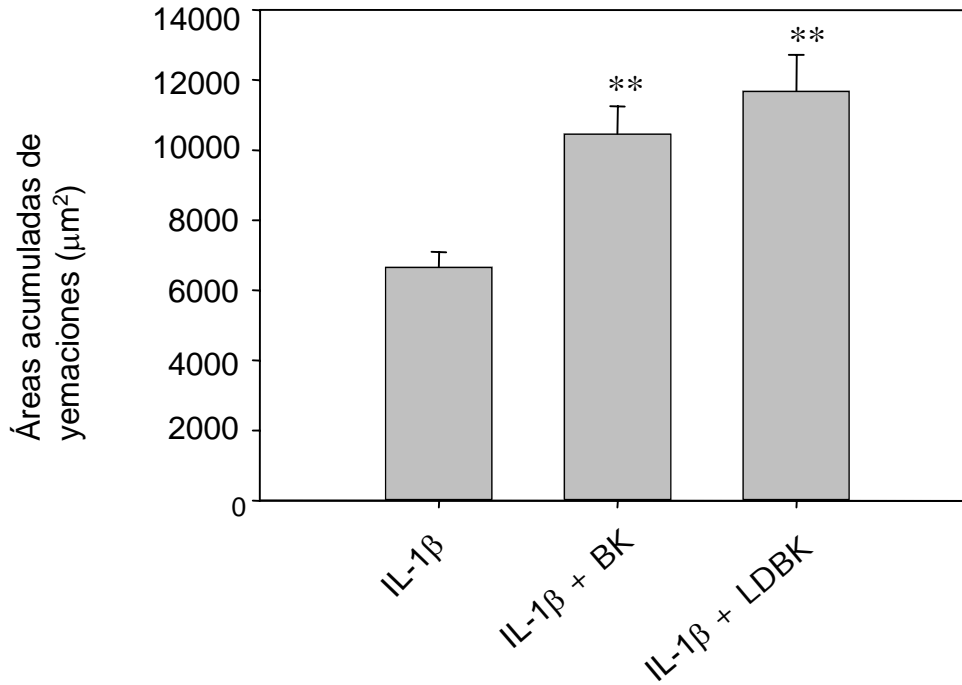


Fig 9 *IL-1β potencia el efecto angiogénico de BK y LDBK sobre esferoides multicelulares de CE EA.hy926* De acuerdo a los ensayos morfométricos realizados, la estimulación de esferoides de CE durante tres días con IL-1β (1 ng/ml) tuvo un notorio efecto angiogénico. En estas condiciones, IL-1β potenció el efecto de BK (100 nM) y de manera notable la acción de LDBK (100 nM). (** $p < 0.005$ vs IL-1β)

4.3 Evidencias morfológicas de la inducción de tubos endotelizados, con lumen, en esferoides de CE tratados con cininas

Los esferoides embebidos en matrices de colágeno tipo I revelaron al corte histológico forma ovalada, una pared constituida de una o varias capas de células EA.hy926 y la presencia de un área central desprovista de células. Esta apariencia fue evidente tanto en los esferoides no estimulados como en aquellos tratados con cininas, bFGF e IL-1 β (Figs 10-13). En el área central de los esferoides se observaron células con características morfológicas compatibles con apoptosis (Fig. 11). En aquellos esferoides estimulados con cininas, bFGF e IL-1 β se produjo la formación de yemas constituidas por una capa de células EA.hy926 y lumen, que recordaban capilares o vénulas (Figs 10 y 11). El empleo de cortes histológicos seriados reveló que algunas de estas yemas correspondían a tubos endotelizados y con lumen (Figs 12 y 13). La detección en este material de BrdU mediante inmunohistoquímica demostró que las CE que formaban estructuras similares a capilares y vénulas y poseían capacidad proliferativa (Figs 10 y 11 d). En los cultivos no estimulados, la presencia de células BrdU $^{+}$ fue menor que en los cultivos estimulados con cininas, bFGF e IL-1 β . Todos estos factores indujeron de manera significativa la incorporación de BrdU, a excepción de LDBK que reveló un efecto similar a los cultivos no estimulados (resultado no mostrado). Las células endoteliales de los esferoides fueron inmunoreactivas a anticuerpos dirigidos contra el Factor von Willebrand (Fig 10, d).

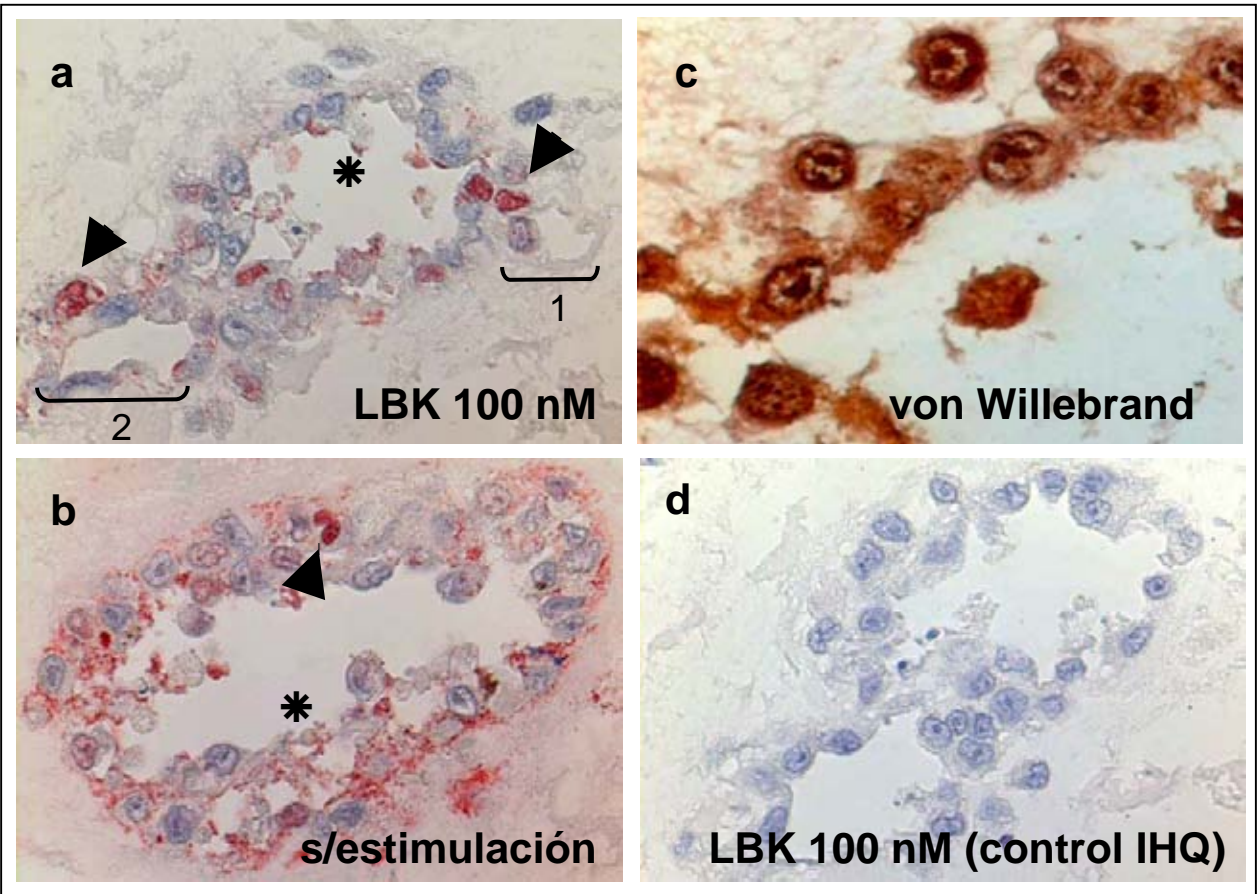


Fig 10 *Apariencia morfológica y capacidad de proliferación en esferoides multicelulares de CE EA.hy926 tratados con LBK* Cortes histológicos de esferoides de CE en matrices de colágeno tipo I, estimulados o no con LBK 100 nM por tres días y pulsados con BrdU antes de ser cosechados. *a)* Incorporación de BrdU en núcleos de CE de esferoides estimulados con LBK (*reacción de color rojo; puntas de flechas*). Las CE BrdU (+) se asocian preferentemente a yemas que poseen lumen y apariencia de capilares o vénulas (*1 y 2*). *b)* Ausencia de yemas de CE en esferoide sin estimulación. Observe el menor número de núcleos BrdU (+) en las CE (*punta de flecha*). Los esferoides tratados con LBK (*a*) y aquellos no tratados (*b*) desarrollaron un lumen central (*asteriscos*). *c)* Inmunoreactividad positiva de las CE EA.hy926 al factor de von Willebrand. *d)* Corte histológico paralelo al mostrado en (*a*) incubado sin primer anticuerpo. (*a-d*, Método de la estreptoavidina-biotina-peroxidasa; *a-c*, revelado con AEC. *d*, revelado con DAB. Tinción de contraste, hematoxilina; *a, b y d*, X320; *c*, X460).

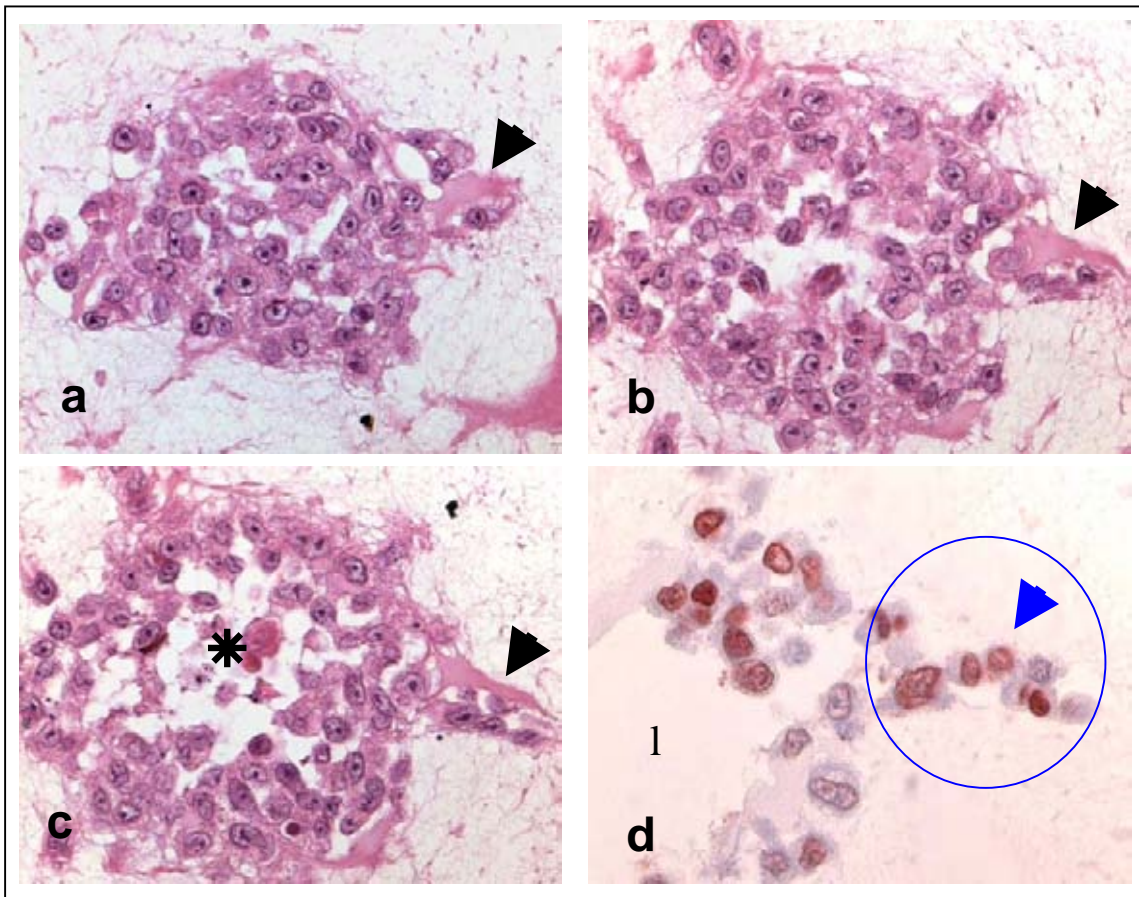


Fig 11 *Inducción de yemas con lumen y capacidad proliferativa en esferoides de CE EA.hy926* (a-d) Cortes histológicos seriados de esferoides de células endoteliales en matrices de colágeno tipo I tratados con BK 100 nM durante tres días. La figura muestra el desarrollo de formaciones tubulares endotelizadas y con lumen (*puntas de flechas*). En (c) el asterisco indica células de apariencia apoptótica en el lumen del esferoide. (d) Los núcleos de las células que forman las yemas fueron inmunoreactivos a anticuerpos anti-BrdU (*círculo*). (a-c, hematoxilina-eosina; d, método de la estreptoavidina-biotina-peroxidasa, contraste hematoxilina; a-c, X320; d, X460).

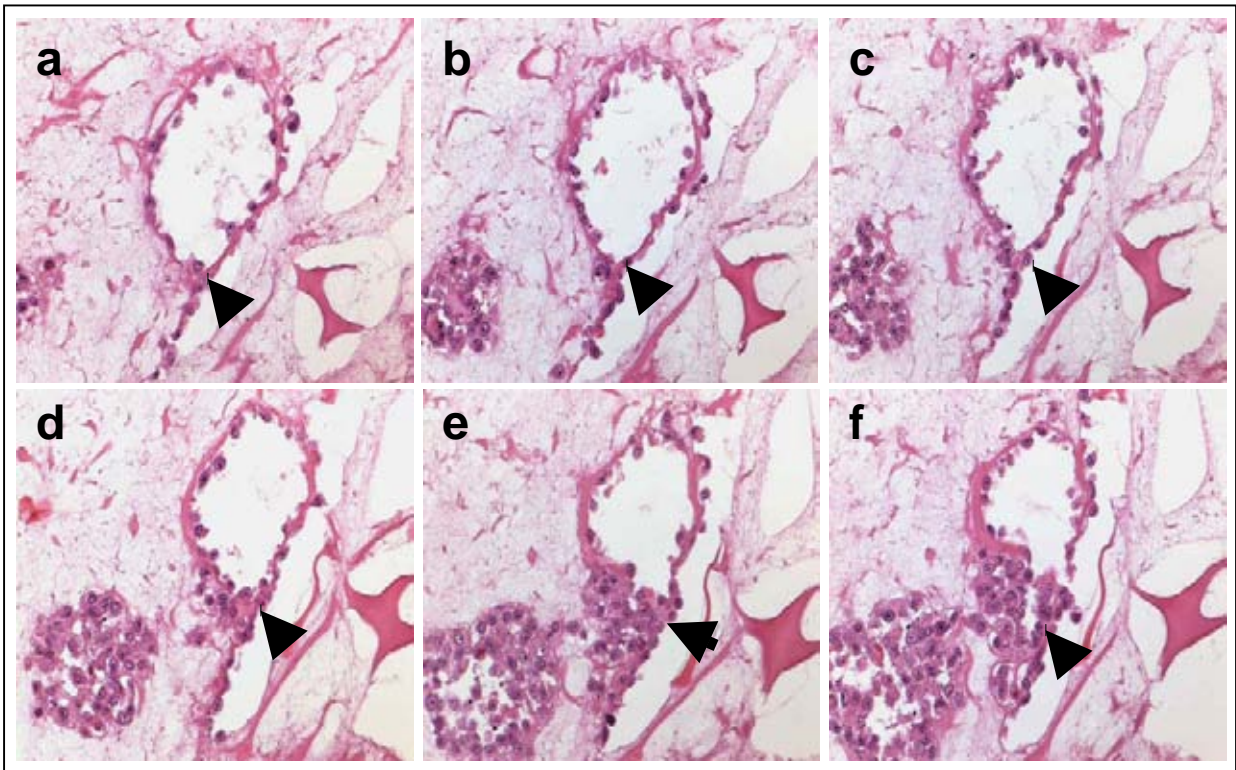


Fig 12 Estructura endotelizada ramificada de un esferoide en cultivos tratados con BK

Cortes histológicos seriados de esferoides de células endoteliales en matrices de colágeno tipo I estimulados con BK 100 nM por tres días. (a-f) Estructura con lumen y cubierta por células endoteliales que en su pared forma un tubo de conexión a un esferoide contiguo (puntas de flechas). (Hematoxilina-eosina; a-f, X320)

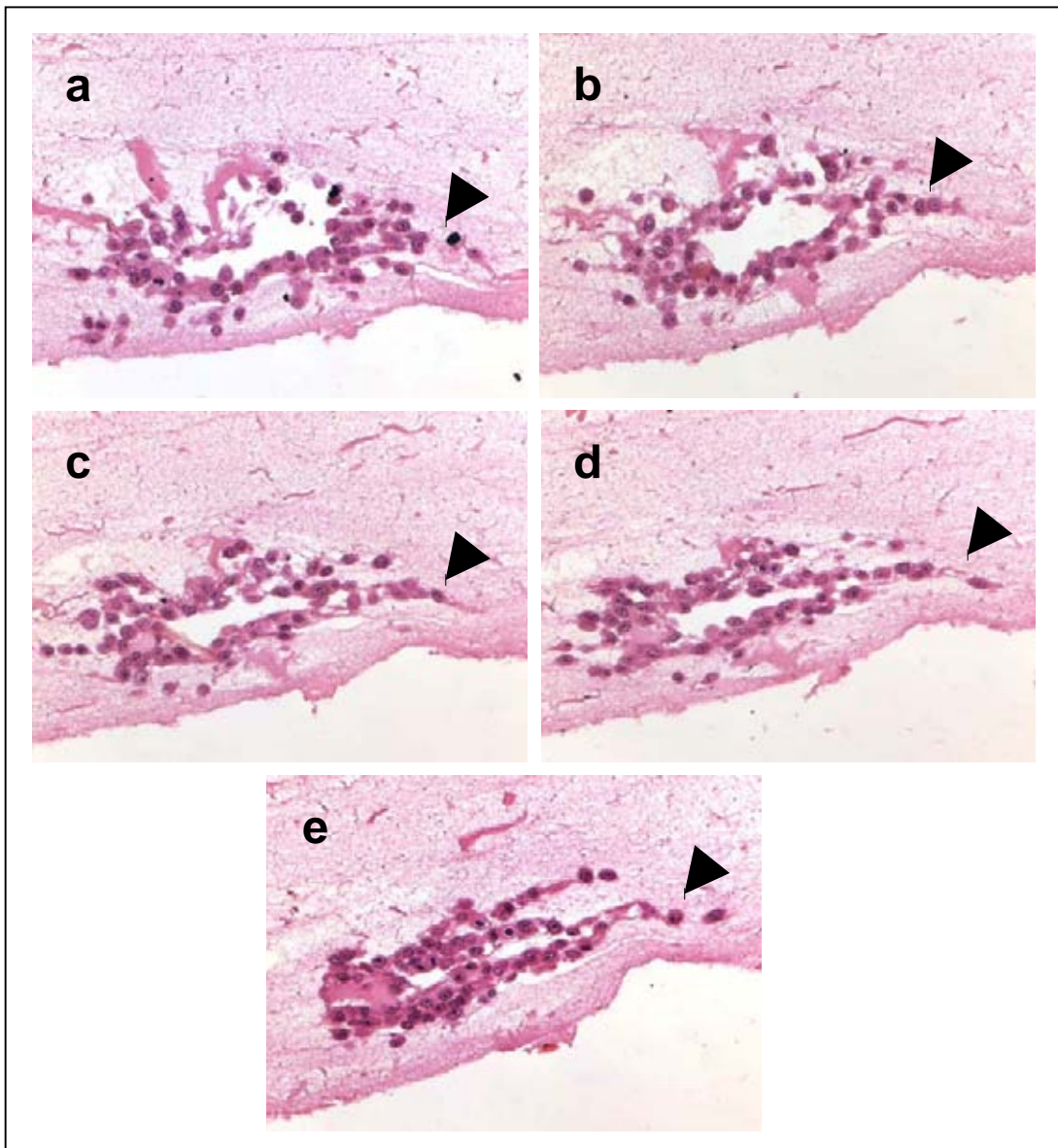


Fig 13 *Ramificación tubular endotelizada y con lumen en un esferoide tratado con BK*

Cortes histológicos seriados de esferoide de CE EA.hy926 en matrices de colágeno tipo I estimulados con BK 100 nM por tres días. (a-e) Ejemplo de estructura tubular endotelizada y con lumen formada desde un esferoide (*puntas de flechas*). (Hematoxilina-eosina; a-e, X320)

5. DISCUSIÓN

En esta Tesis de Grado demostramos que los agonistas de cininas BK, LBK y LDBK inducen la respuesta angiogénica de CE EA.hy926. El empleo de los antagonistas específicos HOE140 y ATB1 y de coestimulación con IL-1 β indica que el efecto de las cininas sería mediado por receptores B₂ y de manera inducible, por receptores B₁. Varios autores habían observado previamente, en animales experimentales, un efecto de cininas compatible con angiogénesis (Silvestre y col, 2001; Emanuelli y Madeddu, 2001; Emanuelli y col, 2002). Adicionalmente, Miura y col (2003) demostraron que las CE cultivadas *in vitro* responden a la estimulación de receptores B₂, formando estructuras que los autores interpretaron como capilares. Nuestros resultados demuestran que tanto los receptores B₂ como B₁ participan en la inducción de la angiogénesis en CE EA.hy926 y con el uso de cortes histológicos seriados, que las estructuras formadas están endotelizadas y poseen lumen.

5.1 Producción de esferoides multicelulares de células endoteliales EA.hy926

La angiogénesis es un complejo proceso morfogénico responsable de la generación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, que conduce a la gradual organización de redes capilares, su maduración y diferenciación en estructuras vasculares específicas. Los cultivos de las CE en monocapas (o cultivos bidimensionales) han sido especialmente informativos acerca de los fenómenos implicados en la regulación de las CE (Sato y Rifkin, 1988; Pepper y col, 1989). Sin embargo, por razones evidentes, estos cultivos no permiten la organización tridimensional característica de las CE de los vasos sanguíneos. Respecto a los cultivos tridimensionales de CE, estos incluyen ensayos de invasión de geles de colágeno o fibrina por

monocapas de CE (Montesano y col, 1983), formación de redes capilares originadas desde CE embebidas entre capas de colágeno o fibrina (Chalupowicz y col, 1995), cultivo de anillos de aorta sobre matrices de colágeno (Go y col, 2003), etc. Cada uno de estos modelos refleja etapas diferentes de la angiogénesis como la invasión, proliferación celular y formación de yemas vasculares. No obstante, frecuentemente en los cultivos tridimensionales las CE pierden sus características fenotípicas diferenciadas y a menudo mueren por apoptosis (Ilan y col, 1998; Dimmeler y Zeiher, 2000).

Recientemente se ha dado a conocer un modelo diferente de estudio de la angiogénesis que emplea esferoides multicelulares de células endoteliales, cultivados en matrices de colágeno (Korff y Augustin, 1999; Korff, 2004 a,b). Originalmente, los esferoides multicelulares fueron utilizados para estudiar la diferenciación embriogénica (Flame y Risau, 1992; Wartenberg y col, 2001) y más recientemente la biología tumoral (Santini y col, 2000; Kelm y col, 2002). Este ensayo posee diversas ventajas. En los esferoides, las CE alcanzan condiciones basales semejantes a las células endoteliales *in vivo*, las cuales revelan una muy baja actividad de recambio o activación (Cines y col, 1998); son capaces de responder a factores de crecimiento y la sobrevida celular aumenta (Korff y Augustin, 1998); tienden a formar una monocapa periférica estabilizada mediante proteínas de adhesión y las células del área central desaparecen por apoptosis, formándose un lumen (Korff y Augustin, 1998; K Korff, 2004). Asimismo, el empleo de un número definido de CE permite producir esferoides de tamaño y número de células conocido, de manera que las condiciones experimentales se estandarizan.

Los experimentos realizados en esta Tesis de Grado revelaron que la producción de esferoides multicelulares de células endoteliales EA.hy926 y su cultivo en matrices de colágeno corresponde a un método simple, extraordinariamente reproducible y angiogénicamente eficiente. Adicionalmente resultó de muy bajo costo. El proceso angiogénico resultante de la estimulación de los cultivos con BK, LBK y LDBK, en ausencia o presencia de IL-1 β , y antagonistas específicos para los receptores B₁ y B₂ pudo ser cuantificado morfométricamente, las estructuras producidas visualizadas en su dimensión tridimensional mediante cortes histológicos seriados y la expresión del factor de von Willebrand, marcador fenotípico de CE, determinado por inmunohistoquímica. Es decir, en las condiciones empleadas por nosotros, estas estructuras, los esferoides de CE, respondieron a estímulos externos y crecieron direccionalmente unos hacia otros, invadiendo la matriz de colágeno y formando estructuras semejantes a vasos sanguíneos primitivos.

Otros autores han usado Matrigel™ para los ensayos de angiogénesis. Este es un gel constituido por laminina, colágeno tipo IV, fibronectina, TGF- β , activador de plasmina, FGF, etc (www.bdbiosciences.com). Sin embargo, la alta capacidad angiogénica de esta matriz dificulta dimensionar el efecto de factores externos potencialmente angiogénicos (Donovan y col, 2001; Montañez y col, 2002). En este trabajo nosotros empleamos matrices preparadas con colágeno extraído de cola de rata, el cual corresponde preferentemente a colágeno tipo I (Schoop y col, 1999). No obstante la conocida menor capacidad de inducción de la angiogénesis de las matrices de colágeno, esta propiedad facilitó la diferenciación de la acción angiogénica neta de las cininas respecto a los basales no estimulados.

5.2 Efecto angiogénico de las cininas

La medición del área de las yemas de CE en los esferoides ha sido empleada por otros autores como medida de cuantificación de la angiogénesis (Korff, 2004 a,b). Con el empleo de este método comprobamos que BK y LBK estimulan la angiogénesis en los esferoides de CE EA.hy926 vía receptores B₂. En una comparación en base molar, este efecto fue más potente al obtenido con bFGF, un conocido factor angiogénico secretado por fibroblastos y CE activadas (Gualandris y col, 1996). Nuestros resultados también mostraron que LBK fue más efectivo que BK. Las cininas BK y LBK generadas por calicreinas plasmáticas y titulares, respectivamente, poseen una alta afinidad por el receptor B₂ en todas las especies de mamíferos; LBK tiene a su vez una significativa afinidad por los receptores B₁ humano y de conejo (Leeb-Lundberg y col, 2005). La promiscuidad de LBK por ambos tipos de receptores podría explicar la respuesta angiogénica de LBK mayor a la de BK observada en nuestros ensayos. El receptor B₂ se encuentra preformado en la mayoría de los tejidos (Dixon, 1994; Dixon y col, 1996) a diferencia de B₁ que característicamente es inducible (Marceau y col, 1998). Precisamente, el efecto angiogénico revelado por BK y LBK está de acuerdo con la expresión constitutiva de los receptores B₂. Nuestra observación que IL-1 β induce un aumento de la respuesta angiogénica de BK concuerda con el rápido pero transitorio aumento de receptores B₂ producido por IL-1 β en células musculares lisas bronquiales (Schmidlin y col, 1998) así como con la inducción de receptores B₂ producida por IL-1 β y TNF- α en fibroblastos IMR-90 (Haddad y col, 2000).

Nuestros resultados también mostraron que la coestimulación con IL-1 β provoca una notable potenciación de la respuesta angiogénica a LDBK. A diferencia del gen del receptor B₂, el gen humano del receptor B₁ contiene una caja TATA de consenso y en la región del promotor múltiples motivos NF- κ B y AP-1 (Leeb-Lundberg y col, 2005). Esta propiedad es consistente

con la característica inducible del receptor B₁ con citoquinas tales como IL-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de necrosis tumoral (TNF)- α , o con SFB, lipopolisacárido (LPS), etc. La inducción de receptores B₁ por IL-1 β es mediada por activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y por el factor nuclear- κ B (NF- κ B) [Campos y col, 1999].

Como se ha mencionado previamente existen evidencias de que las cininas participan en la angiogénesis experimental en animales. La oclusión de la arteria femoral en ratones provoca un aumento en el número de capilares así como en la actividad de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) [Silvestre y col, 2001]. Este efecto incrementa al doble si los animales son tratados con perindopril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Debido a que el inhibidor no tiene efecto en ratones *KO* que no expresan el gen del receptor B₂, los autores concluyeron que el efecto pro-angiogénico de la inhibición de ACE era mediado por el receptor B₂ (Silvestre y col, 2001). No obstante, otros grupos han desarrollado la idea que el receptor B₁, y no el receptor B₂, aceleraría la angiogénesis espontánea por oclusión arterial (Emanuelli y Madeddu, 2001; Emanuelli y col, 2002). Estos autores observaron que el tratamiento con el agonista del receptor B₁ R916 aceleraba la tasa de perfusión y la recuperación de la extremidad correspondiente a la arteria ligada (Emanuelli y col, 2002). Ambos receptores parecen estar implicados en el modelo murino de angiogénesis como lo sugiere el bloqueo que los antagonistas de receptores B₁ y B₂ provocan en la recuperación de la isquemia (Emanuelli y col, 2001). A diferencia de estos trabajos, el modelo de estudio de la angiogénesis utilizado por nosotros nos permitió ensayar *in vitro* la estimulación directa de las CE con agonistas y antagonistas específicos de los receptores B₁ y B₂. Esta aproximación experimental nos facilitó

la visualización de efectos específicos en las CE, evitando el problema de la acción cooperativa de otros tejidos o células y de señales mal definidas de la circulación sistémica. En estas condiciones, el empleo de antagonistas específicos y de IL-1 β permitió demostrar que ambos tipos de receptores estaban implicados en la respuesta angiogénica de cininas. Por lo demás, nuestros resultados están de acuerdo con las evidencias que revelan que las CE vasculares expresan ambos subtipos de receptores (Figueroa y col, 2001).

5.3 Regulación del mecanismo angiogénico de cininas

En nuestro trabajo resultó evidente que IL-1 β actuaba cooperativamente en el efecto angiogénico de BK y de manera sinérgica con LDBK. El efecto de IL-1 sobre cininas es paradigmático. IL-1 es una potente citoquina proinflamatoria e inmunoreguladora, secretada por una amplia variedad de tipos celulares. Las cininas inducen la liberación de citoquinas y las citoquinas aumentan el efecto de las cininas, como ocurre en el caso de IL-1 (Cassim y col, 2002). Es posible imaginar que la ubicuidad de IL-1 en los procesos inflamatorios, así como la de las cininas, genere durante la respuesta inflamatoria un sistema de interacciones moleculares de notables efectos proangiogénicos. Existen dos proteínas agonistas de IL-1: IL-1 α e IL-1 β . Ambas se unen al mismo receptor y no poseen diferencias de actividad significativa. Mientras que IL-1 α es activa como molécula asociada a membrana, IL-1 β es un producto secretorio que se encuentra en la circulación (Dinarello, 1996). La importancia del efecto angiogénico de IL-1 ha sido ampliamente reconocido, habiéndose prestado especial atención a su acción en la progresión tumoral (Saijo y col, 2002). Mediante el empleo de trasplantes de tumores en ratones *KO* para el gen de IL-1 α e IL-1 β , Voronov y col (2003) demostraron que los implantes de MatrigelTM que portaban células tumorales se vascularizaban a condición que el implante

contuviese además IL-1. De manera interesante, en este trabajo se demostró que IL-1 inducía la producción de VEGF. Fan y col (2004) han aportado evidencias adicionales respecto a los mecanismos celulares implicado en la acción angiogénica de IL-1 β . Estos autores comprobaron en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) que IL-1 β al disminuir los niveles de mRNA para angiopoyetina-1 provoca un efecto proangiogénico. Esta acción, que es mediada por fosforilación de p38, es acompañada de un aumento en la producción de VEGF. Resulta importante señalar que BK transactiva de manera específica el receptor KDR/Flk-1 para VEGF en células endoteliales de arteria coronaria humana e induce la activación de eNOS (Miura y col, 2003). Coincidentemente, los receptores B₁ promueven la angiogénesis en la córnea de conejo mediante sobre expresión de bFGF en CE vía activación de eNOS (Parenti y col, 2001). Así, el efecto cooperativo de IL-1 β sobre las cininas resultaría en una ganancia neta de estímulos proangiogénicos. Resulta tentador considerar la posibilidad de que en la acción cooperativa de IL-1 β sobre cininas se encuentre implicada la sobre expresión de dos de los más potentes factores angiogénicos conocidos, VEGF y bFGF, la inhibición de actividad antiangiogénica dependiente de CE, y la activación de la vía de eNOS.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran que el cultivo tridimensional de esferoides constituye un modelo avanzado para el estudio *in vitro* de la angiogénesis. El precultivo de CE EA.hy926 como esferoides multicelulares facilita su respuesta a factores con capacidad angiogénica y la formación de yemas y tubos endotelizados con lumen. El desarrollo de equivalentes dermo-epidérmicos que contengan plexos vasculares, inducidos con el método de angiogénesis empleado en esta Tesis, permitiría el desarrollo de equivalentes

cutáneos de mayor semejanza al tejido *in situ* y más apropiados para el estudio experimental de la biología cutánea.

6. LITERATURA CITADA

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

Augustin H. (2001) Tubes, branches and pillars. The many ways of forming a new vasculature. *Circ Res.*, 89, 645-647.

Beck L, D'amore P. (1997) Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.*, 11: 365-373.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. (1992) Bioregulation of Kinins: Kallikreins, Kininogens, and Kininases. *Pharmacol. Rev* 44: 1-80.

Breier G, Risau, W. (1996) The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol.*, 6, 454-456.

Campos MM, Souza GE, Calixto JB (1999) In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappa B pathways. *Br J Pharmacol.*, 127, 1851-1859.

Carmeliet P. (2000) Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med.*, 6, 398-395.

Cassim B, Mody G, Bhoola K. (2002) Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacol Ther.*, 94, 1-34.

Chalupowicz DG, Chowdhury ZA, Bach TL, Barsigian C, Martínez J. (1995) Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation. *J Cell Biol.*, 130(1), 207-215.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt A-M, Stern DM.(1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.*, 91(10), 3527-3561.

Clark RAF. (2003) Epithelial-mesenchymal networks in wounds: a hierarchical view. *J Invest Dermatol* 120: ix-xi

Dimmeler S, Zeiher A. (2000) Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res.*, 87, 434-439.

Dinarello CA. (1996) Biologic basis for interleukin-1in disease. *Blood.*, 87(6), 2095-2147.

Dixon BS. (1994) Cyclic AMP selectively enhances bradykinin receptor synthesis and expression in cultured arterial smooth muscle. Inhibition of angiotensin II and vasopressin response. *J Clin Invest.*, 93, 2535-2544.

Dixon BS, Sharma RV, Dennis MJ. (1996) The bradykinin B2 receptor is a delayed early response gene for platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.*, 271, 13324-13332.

Donovan D, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. (2001) Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis.*, 4, 113-121.

Edgell C J S, McDonald C C, Graham J B. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hibridation. *PNAS.*, 80, 3734 –3737.

Emanuelli C, Madeddu P. (2001) Targeting kinin receptors for the treatment of tissue ischaemia. *Trends Pharmacol Sci.*, 22(9), 478-484.

Emanuelli C, Bonaria SM, Stacca T, Pintus G, Kirchmair R, Isner JM, Pinna A, Gaspa L, Regoli D, Cayla C, Pesquero JB, Bader M, Madeddu P. (2002) Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation.*, 105(3), 360-366.

Fan F, Stoeltzing O, Liu W, McCarty MF, Jung YD, Reinmuth N, Ellis LM. (2004) Interleukin-1beta regulates angiopoietin-1 expression in human endothelial cells. *Cancer Res.*, 64, 3186-3190.

Figuerola CD, Marchant A, Novoa U, Förstermann U, Jarnagin K, Schölkens B, Müller-Esterl Werner. (2001) Differential Distribution of Bradykinin B₂ Receptors in the Rat and Human Cardiovascular System. *Hypertension.*, 37, 110-120.

Flamme I, Frölich T, Risau W. (1997) Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J cell physiol.*, 173, 206-210.

Flamme I, Risau W. (1992) Induction of vasculogénesis and hematopioesis in vitro. *Development.*, 116, 435-439.

Folkman J, Shing Y. (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem.*, 167(16),10931-10934.

Go RS, Ritman EL, Owen WG. (2003) Angiogenesis in rat aortic rings stimulated by very low concentrations of serum and plasma. *Angiogenesis.*, 6, 25-29.

Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, Nelli EE, Bastaki M, Molinari-Tosatti MP, Bonardi F, Parolini S, Albini A, Morbidelli L, Ziche M, Corallini A, Possati L, Vacca A, Ribatti D, Presta M. (1996) Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth Diff.*, 7, 147-160.

Haddad E-B, Fox AJ, Rousell J, Burgess G, McIntyre P, Barnes PJ, Chun KF. (2000) Post-transcriptional regulation of bradykinin B₁ and B₂ receptor gene expression in human lung

fibroblasts by tumor necrosis factor- α : modulation by dexamethasone. *Mol Pharmacol.*, 57, 1123-1131.

Ilan N, Mahooti S, Madri JA. (1998) Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci.*, 111, 3621-3631.

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

Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. (2003) Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng.*, 83, 173-180.

Korff T , Augustin H. (1998) Integration of endothelial cell in multicellular spheroids prevent apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol.*, 143(5), 1341-1352.

Korff T , Augustin H. (1999) Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting . *J Cell Sci.*, 112, 3249-3258.

Korff T. (2004 a) Three-Dimensional Spheroid Culture of Endothelial Cells. Springer Lab Manual: Methods in Endothelial Cell Biology, Ed. Augustin, H. Springer Verlag Berlin Heidelberg. Chapter 6 p55-62 (*page proofs*).

Korff T. (2004 b) Three-Dimensional *in Vitro* Angiogenesis Assays. *En Springer Lab Manual: Methods in Endothelial Cell Biology*, Ed. Augustin, H. Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Chapter 12 p 115-123 (*page proofs*).

Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.*, 57(1), 27-77.

Maas-Szabowski N, Stark HJ, Fusenig NE. (2002) Cell interaction and epithelial differentiation. *En Culture of Epithelial Cells*. Eds. Freshney RI, Freshney MG. Wiley-Liss, Glasgow, Second Edition, p31-63.

Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. (1998) The B1 receptors for Kinins. *Pharmacol Rev.*, 50, 357-386

Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin J-P, Petitclerc E, Molinaro G, Adam A. (2002) Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol.*, 2, 1729-173.

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

Montañez E, Casaroli-Marano RP, Vilaró S, Pagan R. (2002) Comparative study of tube assembly in three-dimensional collagen matrix and matrigel cotas. *Angiogenesis.*, 5, 167-172.

Montesano R, Orci L, Vassalli P. (1983) In Vitro Rapid Organization of Endothelial Cells into Capillary-like Networks Is Promoted by Collagen Matrices. *J Cell Biol.*, 97, 1648-1652.

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

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

Pepper MS, Spray DC, Chanson M, Montesano R, Orci L, Meda P. (1989) Junctional communication is induced in migrating capillary endothelial cell. *J Cell Biol.*, 109, 3027-3038.

Risau W. (1997) Mechanism of angiogenesis. *Nature.*, 386, 671-674.

Saijo Y, Tanaka M, Miki M, Usui K, Suzuki T, Maemondo M, Hong X, Tazawara R, Kikuchi T, Matsushima K, Nukiwa T. (2002) Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. *J Immunol.*, 169, 469-475.

Santini MT, Rainaldi G, Indovina PT. (2000) Apoptosis, cell adhesion and extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev oncology hematology.*, 36, 75-87.

Sato Y, Rifkin DB. (1988) Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol.*, 107, 1199-1205.

Schmidlin F, Scherrer D, Daeffler L, Bertrand C, Landry Y, Gies JP. (1998) Interleukin-1beta induces bradykinin B2 receptor gene expression through a prostanoid cyclic AMP-dependent pathway in human bronchial smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.*, 53, 1009-1015.

Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. (1999) Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocyte in organotypic cocultures with human dermal fibroblast. *J Invest Dermatol.*, 112, 343-353.

Shibuya M. (2001) Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.*, 26(1), 25-35.

Silvestre J-S, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levi BI. (2001) Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B2 receptor pathway. *Circ Res.*, 89, 678-683.

Singer AJ, Clark RAF. (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.*, 341,738-746.

Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. (2002) IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *PNAS.*, 100 (5), 2645-2650.

Wartenberg M, Dönmez F, Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H. (2001) Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation culture of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *FASEB J.*,15, 995-1005.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.*, 407, 242-248.

Zhou X, Polgar P, Taylor L. (1998) Roles for interleukin-1 β phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B1 receptor gene expresión. *Biochem J.*, 330, 361-366.

7. ANEXO

7.1 Preparación de solución stock de metilcelulosa

Toda la preparación se realizó de manera estéril. Para ello se autoclavaron 6 gr de metilcelulosa en polvo en botella de cultivo tipo Schott de 500 ml que contenía además un agitador magnético. A la metilcelulosa autoclavada se le agregaron 250 ml de medio DMEM estéril precalentado a 60°C y se agitó por 20 minutos. Luego, se agregaron 250 ml de DMEM a temperatura ambiente para completar un volumen final de 500 ml y se continuó la agitación por 1-2 horas a 4°C hasta la disolución total. La solución obtenida, de aspecto viscoso, fue alicuotada en tubos de centrifuga de 50 ml (tipo Nalgene) y clarificada por centrifugación a 5.000 g durante 2 hr a temperatura ambiente. El sobrenadante claro y altamente viscoso fue recuperado y el precipitado restante descartado (se recupera aproximadamente el 95% de la solución). Esta solución fue guardada de manera estéril en tubos de cultivo de 50 ml a 4°C por tiempos que no han superado los 6 meses.

7.2 Aislamiento y preparación de solución stock de colágeno tipo I

Normalmente se emplearon dos colas de ratas de ‘desecho’. Las colas fueron abiertas con varios cortes sagitales hechos con bisturí y la piel eliminada utilizando pinzas quirúrgicas. A continuación, desde el extremo distal, cada tendón fue separado a lo largo de la cola. Este material, correspondiente a fibras de colágeno y que presentaba un típico aspecto de “hilos color nácar”, se expuso 2 horas a luz UV en la cámara de flujo laminar y luego se pesó en condiciones estériles. Mediante solubilización en ácido acético 0.1% se llevó a una concentración final de 4 mg/ ml (p/v) y se mantuvo en agitación por 48 horas a 4°C. La solución obtenida, de aspecto

viscoso y opalescente, fue centrifugada a 1200 rpm (253 g) por 30 minutos, el precipitado descartado y el remanente conservado a 4°C o congelado a -20°C hasta su utilización. La duración en estas condiciones es de al menos un año.