

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA



**IMPLICACIÓN DE LA ENDOGLINA
EN LA ANGIOGÉNESIS Y LA
REPARACIÓN DE HERIDAS**

MARTA PRIETO VICENTE

2005

D. José Juan García Marín, Director del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, elaborada por Dña. Marta Prieto Vicente para optar al grado de Doctor en Farmacia, con el título: **“IMPLICACIÓN DE LA ENDOGLINA EN LA ANGIOGÉNESIS Y LA REPARACIÓN DE HERIDAS”**, ha sido realizada bajo la dirección del Doctor D. Fernando Pérez Barriocanal y de la Doctora Dña. Alicia Rodríguez Barbero, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a 23 de Febrero de 2005.

Fdo: D. José Juan García Marín

D. FERNANDO PÉREZ BARRIOCANAL, Profesor Titular de Fisiología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca y la Doctora **Dña. ALICIA RODRÍGUEZ BARBERO**, Investigador Ramón y Cajal del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo, titulado **“IMPLICACIÓN DE LA ENDOGLINA EN LA ANGIOGÉNESIS Y LA REPARACIÓN DE HERIDAS”**, presentado por **Dña. Marta Prieto Vicente** para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y considerando que cumple las condiciones necesarias lo consideran finalizado, y autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Salamanca, a 23 de Febrero de 2005.

Fdo: D. Fernando Pérez Barriocanal

Fdo: Dña. Alicia Rodríguez Barbero

Ahora que el trabajo está terminado, me gustaría expresar mi agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado durante estos años en la realización de la tesis:

A mis directores, Fernando y Alicia,
gracias por vuestra confianza en mí desde el primer día, por vuestra dedicación, por vuestra buena disposición en todo momento y por todo lo que me habéis enseñado cada uno en vuestro campo.

A José Miguel,
gracias por darme la oportunidad de trabajar en este grupo, por el seguimiento continuo del trabajo y por tus brillantes ideas y discusiones.

A todos mis compañeros, hoy muchos de ellos amigos,
gracias por haber mantenido durante estos años un magnífico ambiente de trabajo, por haber estado siempre dispuestos a ayudarme, por vuestro apoyo, compañía y por todo lo que he aprendido de vosotros. Y muy especialmente quiero agradecer a Dele, Mirjana y Miguel su colaboración en los experimentos de esta tesis.

A mis amigos,
gracias por el interés que habéis mostrado por la marcha de la tesis, por los ánimos y por estar ahí siempre que os he necesitado.

Y por supuesto, a mi familia,
muchas gracias por vuestro constante apoyo, cariño y comprensión.

*Quien tiene la voluntad
tiene la fuerza*

Menandro (342-292 A.C.)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	9
1. Angiogénesis	13
1.1. Fisiología de los vasos sanguíneos	13
1.1.1. El endotelio	15
1.2. Secuencia de eventos en la angiogénesis	17
1.2.1. Fase de activación: inducción de la respuesta angiogénica	18
1.2.2. Fase de progresión: proliferación y migración de las células endoteliales	19
1.2.3. Fase de resolución: terminación y maduración	20
1.3. Control fisiológico de la angiogénesis	20
1.3.1. Hipoxia / Factores inducibles por hipoxia-	21
1.3.2. Ligandos y receptores	23
1.3.2.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular	23
1.3.2.2. Factores de crecimiento fibroblástico	26
1.3.2.3. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas	26
1.3.2.4. Receptor esfingolípido de diferenciación endotelial acoplado a proteínas G-1	27
1.3.2.5. Angiopoyetina 1/Angiopoyetina 2/Tie-2	27
1.3.2.6. Factor de crecimiento transformante β 1	28
1.3.3. Moléculas de interacción célula-célula	34
1.3.4. Moléculas de interacción célula-matriz extracelular	34
1.3.5. Leucocitos	36
1.4. Angiogénesis específica de órganos	36
1.5. Implicaciones patológicas de la angiogénesis	37
1.5.1. Enfermedades caracterizadas o causadas por angiogénesis insuficiente o regresión de los vasos	37
1.5.2. Enfermedades caracterizadas o causadas por una angiogénesis anormal o excesiva	39
2. Arteriogénesis	40
2.1 Regulación de la arteriogénesis	41
3. Vasculogénesis	42
3.1. Regulación de la vasculogénesis	43

4. Regresión de vasos	43
4.1. Regulación de la regresión de vasos	44
5. Reparación de heridas	45
5.1. Fisiología de la piel	46
5.1.1. Epidermis	47
5.1.2. Dermis	48
5.1.3. Hipodermis	49
5.1.4. Anexos de la piel	49
5.1.5. Irrigación de la piel	50
5.1.6. Inervación	51
5.2. Secuencia de eventos en la reparación de heridas cutáneas	51
5.2.1. Fase temprana: hemostasia e inflamación	52
5.2.2. Fase intermedia o proliferativa: fibroplasia, angiogénesis y epitelización	54
5.2.3. Fase tardía: remodelado	56
5.3. Regulación de la cicatrización de heridas cutáneas	57
6. Endoglina	58
6.1. Estructura y características moleculares	58
6.2. Función	60
6.3. Mecanismo de acción	60
6.4. Regulación de la expresión	62
6.5. Endoglina y telangiectasia hemorrágica hereditaria	62
6.6. Endoglina y angiogénesis	64
6.7. Endoglina y tumores	66
6.8. Endoglina y procesos de desarrollo y reparación	67
6.9. Endoglina y óxido nítrico	68
OBJETIVOS	71
MATERIALES Y MÉTODOS	75
1. Materiales	77
2. Animales de experimentación	77
2.1. Consideraciones previas	77

2.2. Origen de los animales	77
2.3. Dieta y condiciones ambientales	78
3.- Extracción de tejidos	79
4.- Ligadura de la arteria femoral	79
4.1. Procedimiento quirúrgico	79
4.2. Monitorización del flujo sanguíneo	79
4.3. Inhibición de la síntesis de NO	80
4.4. Extracción del tejido muscular	80
4.5. Extracción de plasma	81
5.- Heridas cutáneas	81
5.1. Procedimiento quirúrgico y obtención de curvas de cicatrización	81
5.2. Inhibición de la síntesis de NO	82
6. Cultivo de anillos de aorta	82
6.1. Seguimiento y cuantificación del crecimiento de los pseudocapilares	84
7. Obtención de cultivos celulares primarios	84
7.1. Cultivo primario de células endoteliales de aorta de ratón	84
7.1.1. Extracción de los pseudocapilares del <i>Matrigel</i>	84
7.1.2. Seguimiento y condiciones del cultivo	85
7.2. Cultivo primario de fibroblastos de piel de ratón	86
7.2.1. Seguimiento y condiciones del cultivo	87
8. Técnicas básicas en cultivos celulares	87
8.1. Tripsinización celular	87
8.2. Recuento del número de células	88
9. Determinación de nitritos en plasma	88
9.1. Reacción de Griess y lectura de las absorbancias	88
10. Inmunohistoquímica	89
10.1. Preparación de los tejidos	89
10.2. Marcaje de las preparaciones	89
11. Análisis de la densidad capilar	90

12. Inmunofluorescencia	91
12.1. Condiciones celulares	91
12.2. Marcaje de las células	91
12.3. Análisis de las preparaciones	92
13. Western blot	92
13.1. Obtención de extractos de proteínas titulares	92
13.2. Obtención de fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas renales	93
13.3. Obtención de extractos de proteínas celulares	93
13.3.1. Condiciones celulares	93
13.3.2. Lisado celular	94
13.4. Determinación de la concentración de proteínas	94
13.5. Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia	94
13.6. Bloqueo e incubación con los anticuerpos	95
13.7. Reutilización de las membranas	97
14. Northern blot	97
14.1. Extracción de ARN del tejido muscular	97
14.2. Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia	98
14.3. Preparación de las sondas	98
14.4. Hibridación	99
14.5. Reutilización de las membranas	100
15. ELISA de VEGF	100
15.1. Condiciones celulares, tratamiento y recogida de muestras	100
15.2. Procesamiento de las muestras	101
16. Formación de pseudocapilares de CEAR en Matrigel	101
17. Determinación del ciclo celular mediante citometría de flujo	102
17.1. Condiciones celulares	102
17.2. Recogida de las células	102
17.3. Tinción con yoduro de propidio y pase por el citómetro de flujo	102

18. Cuantificación del número de células por cristal violeta	103
18.1. Condiciones celulares	103
18.2. Tinción de los núcleos y lectura de las absorbancias	103
18.3. Curva absorbancia/número de células	104
19. Reparación de “heridas” en la monocapa de células	104
19.1. Condiciones celulares	104
19.2. Realización de las “heridas” y estudio de la migración celular	104
20. Migración celular a través de membranas	105
20.1. Siembra e incubación de las CEAR en los insertos	105
20.2. Fijación de las CEAR a la membrana, tinción de los núcleos y lectura de las absorbancias	105
21. Incorporación de [³H]-prolina a proteínas colágenas	106
21.1. Condiciones celulares y tratamientos	106
21.2. Recogida de las muestras	107
21.3. Procesamiento de las muestras	107
22. Transfección celular con endogлина humana	108
22.1. Condiciones celulares	108
22.2. Preparación de los complejos jetPEI™/ADN y procedimiento de transfección	108
23. Cuantificación del ADN	109
23.1. Reacción de la difenilamina y lectura de las absorbancias	109
24. Análisis estadístico	110
Apéndice 1. Relación de reactivos y productos	112
Apéndice 2. Relación de anticuerpos	115
Apéndice 3. Relación de material utilizado	116
Apéndice 4. Relación de equipos utilizados	117

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
1. Expresión de endoglina en tejidos de ratones <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	121
2. Angiogénesis post-isquémica en ratones <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	123
3. Expresión del ARNm de VEGF, COX-2 y TGF-β1 en el músculo aductor después de la isquemia	127
4. Expresión del ARNm de endoglina en el músculo después de la isquemia	131
5. Expresión de NOS en tejidos de ratones <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	133
6. Expresión de eNOS en el músculo después de la isquemia	134
7. Angiogénesis post-isquémica en ratones <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-} tratados con L-NAME	136
8. Angiogénesis <i>in vitro</i> a partir de anillos de aorta de ratones <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	140
9. Cultivo y caracterización de células endoteliales de aorta de ratón <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	144
9.1. Morfología	145
9.2. Marcadores celulares	147
10. Expresión de endoglina en las CEAR <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	150
11. Expresión de eNOS en las CEAR <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	152
12. Efecto de la haploinsuficiencia de endoglina en la proliferación de las CEAR	153
13. Efecto de la haploinsuficiencia de endoglina en la migración de las CEAR	157
14. Efecto de la haploinsuficiencia de endoglina en la acumulación de matriz extracelular en las CEAR	160
15. Efecto de la haploinsuficiencia de endoglina en la liberación de VEGF endógeno en las CEAR	164
16. Resumen de los estudios de angiogénesis <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	167
17. Cicatrización de heridas cutáneas en ratones <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	169

18. Cicatrización de heridas cutáneas en ratones <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-} tratados con L-NAME	171
19. Cultivo de fibroblastos de piel de ratones <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	175
20. Expresión de endogлина en los FPR <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	177
21. Expresión de eNOS en los FPR <i>Eng</i>^{+/+} y <i>Eng</i>^{+/-}	178
22. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la proliferación de los FPR	180
23. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la migración de los FPR	182
24. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la acumulación de matriz extracelular en los FPR	183
25. Resumen de los estudios de cicatrización <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	187
CONCLUSIONES	189
BIBLIOGRAFÍA	193

*Dila -Dijo Don Quijote-
y sé breve en tus razonamientos;
que ninguno hay gustoso si es largo*

Miguel de Cervantes (1547-1616)

ABREVIATURAS

- Ac:** Anticuerpo
- AcM:** Anticuerpo Monoclonal
- AcP:** Anticuerpo Policlonal
- ADNc:** ADN cíclico
- AEDT:** Ácido Etilendiaminotetraacético
- aFGF:** Factor de crecimiento fibroblástico ácido (de *acid Fibroblast Growth Factor*)
- ALK:** Receptor de activina tipo quinasa (de *Activin receptor-Like Kinase*)
- Ang:** Angiopoyetina
- ANOVA:** Análisis de la Varianza
- APS:** Amonio Persulfato
- ARNm:** ARN mensajero
- ARNt:** ARN de transferencia
- AT:** Antitrombina
- bFGF:** Factor de crecimiento fibroblástico básico (de *basic Fibroblast Growth Factor*)
- BMP:** Proteína morfogénica del hueso (de *Bone Morphogenetic Protein*)
- BMPR:** Receptor de BMP (de *BMP Receptor*)
- BSA:** Albúmina sérica bovina (de *Bovine Serum Albumin*)
- CAM:** Molécula de adhesión celular (de *Cell Adhesion Molecule*)
- CDI:** Inhibidor del derivado del cartilago (de *Cartilage-Derived Inhibitor*)
- CEAR:** Células Endoteliales de Aorta de Ratón
- Cols.:** Colaboradores
- Co-Smads:** Smads mediadoras comunes (de *Common mediator Smads*)
- COX:** Ciclooxygenasa
- CTGF:** Factor de crecimiento del tejido conectivo (de *Connective Tissue Growth Factor*)
- CyTM3:** Cianina 3 (de *Cyanine 3*)
- DEPC:** Dietil-Pirocarbonato
- ECA:** Enzima Convertidora de Angiotensina
- ECGS:** Suplemento para el crecimiento de células endoteliales (de *Endothelial Cell Growth Supplement*)
- EDCF:** Factor de constricción derivado del endotelio (de *Endothelium-Derived Constricting Factor*)
- EDG1:** Receptor esfingolípido de diferenciación endotelial acoplado a proteínas G-1 (de *Endothelial Differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1*)

- EDGF:** Factor de crecimiento derivado del endotelio (de *Endothelial-Derived Growth Factor*)
- EDHF:** Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (de *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*)
- EDRF:** Factor relajante derivado del endotelio (de *Endothelium-Derived Relaxing Factor*)
- EEM:** Error Estándar de la Media
- EGF:** Factor de crecimiento epidérmico (de *Epidermal Growth Factor*)
- Eng^{+/+}:** Endoglina +/+
- Eng^{+/-}:** Endoglina +/-
- eNOS:** NOS endotelial (de *endothelial NOS*)
- Erk:** Quinasas reguladas por señales extracelulares (de *Extracellular signal-regulated kinases*)
- FGF:** Factores de crecimiento fibroblástico (de *Fibroblast Growth Factors*)
- Flk:** Quinasa tipo fms (de *Fms-like kinase*)
- Flt:** Tirosina quinasa tipo fms (de *Fms-like tyrosine kinase*)
- FPR:** Fibroblastos de Piel de Ratón
- G-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos (de *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*)
- GDF:** Factor de crecimiento y diferenciación (de *Growth Differentiation Factor*)
- GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (de *Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factors*)
- hCG:** Gonadotropina coriónica humana (de *human Chorionic Gonadotropin*)
- HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos (de *Hepatocyte Growth Factor*)
- HHT:** Telangiectasia hemorrágica hereditaria (de *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*)
- HIF:** Factor de transcripción inducible por hipoxia (de *Hypoxia-Inducible Factor*)
- [³H]-prolina:** Prolina marcada con tritio
- HUVEC:** Células endoteliales humanas procedentes de la vena umbilical (de *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)
- HRP:** Peroxidasa de rábano desarrollada en caballo (de *Horse Radish Peroxidase*)
- IFN (o IF):** Interferon
- IGF:** Factor de crecimiento tipo insulina (de *Insulin-like Growth Factor*)
- IgG:** Inmunoglobulina G
- IL:** Interleuquina
- iNOS:** NOS inducible (de *inducible NOS*)

- IP:** Proteína inducible por interferón (de *Interferon inducible Protein*)
- I-Smads:** Smads inhibitoras (de *Inhibitory Smads*)
- JNK:** Quinasas c-Jun amino-terminal (de *c-Jun N-terminal Kinases*)
- KDR:** Región de dominio quinasa (de *Kinase Domain Region*)
- KGF:** Factor de crecimiento de queratinocitos (de *Keratinocyte Growth Factor*)
- LAP:** Péptido asociado de latencia (de *Latency-Associated Peptide*)
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad (de *Low-Density Lipoproteins*)
- L-endogлина:** Endogлина larga (de *Large endoglin*)
- L-NAME:** N-nitro-L-Arginina Metil Éster
- LT:** Leucotrienos
- LTB₄:** Leucotrieno B₄
- LTBP:** Proteína de unión al TGF-β latente (de *Latent TGF-β Binding Protein*)
- LTC₄:** Leucotrieno C₄
- LTD₄:** Leucotrieno D₄
- LTE₄:** Leucotrieno E₄
- MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos (de *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
- MHC:** Complejo de histocompatibilidad mayor (de *Major Histocompatibility Complex*)
- MCP:** Proteína quimioatrayente de monocitos (de *Monocyte Chemoattractant Protein*)
- MOPS:** Sal sódica del ácido morfolino-propenosulfónico (de *Morpholino-Propanesulfonic acid, Sodium salt*)
- NF:** Factor nuclear (de *Nuclear Factor*)
- nNOS:** NOS neuronal (de *neuronal NOS*)
- NO:** Óxido nítrico (de *Nitric Oxide*)
- NOS:** Óxido nítrico sintasa (de *Nitric Oxide Synthase*)
- PAF:** Factor activador de las plaquetas (de *Platelet-Activating Factor*)
- PAGE:** Gel de poli(acrilamida) para electroforesis (de *Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*)
- PAI:** Inhibidor del activador de plasminógeno (de *Plasminogen Activator Inhibitor*)
- pb:** Pares de bases
- PBS:** Solución salina tamponada con fosfatos (de *Phosphate Buffered Saline*)
- PBS-CM:** PBS con iones Calcio y Magnesio
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (de *Polymerase Chain Reaction*)

- PD-ECGF:** Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de las plaquetas (de *Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor*)
- PDGF:** Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (de *Platelet-Derived Growth Factor*)
- PDGFR:** Receptor de PDGF (de *PDGF Receptor*)
- PECAM:** Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria (de *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*)
- p-eNOS:** fosfo eNOS (de *phospho eNOS*)
- PF:** Factor plaquetario (de *Platelet Factor*)
- PFA:** Paraformaldehído
- PGE₂:** Prostaglandina E₂
- PGF_{2α}:** Prostaglandina F_{2α}
- PGI₂:** Prostaglandina I₂ (prostaciclina)
- PIGF:** Factor de crecimiento placentario (de *Placenta Growth Factor*)
- PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (de *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride*)
- PRP:** Proteína relacionada con proliferina (de *Proliferin related Protein*)
- PVDF:** Difluoruro de polivinilideno (de *Polyvinylidene Fluoride*)
- RGD:** Secuencia arginina-glicina-ácido aspártico
- R-Smads:** Smads reguladas por receptor (de *Receptor-regulated Smads*)
- SARA:** Anclaje de las Smads para la activación del receptor (de *Smad Anchor for Receptor Activation*)
- SBF:** Suero Bovino Fetal
- SDS:** Dodecilsulfato sódico (de *Sodium Dodecyl Sulfate*)
- S-endoglina:** Endoglina corta (de *Short endoglin*)
- SIDA:** Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida
- Smads:** De *Small mothers against decapentaplegic*
- SPARC:** Proteína secretada ácida y rica en cisterna (de *Secreted Protein, Acidic, Cysteine-Rich*)
- SSC:** Solución Salina Concentrada
- TβR:** Receptor de TGF-β (de *TGF-β Receptor*)
- TCA:** Ácido tricloroacético (de *Tri-Chloroacetic Acid*)
- TGF:** Factor de crecimiento transformante (de *Transforming Growth Factor*)
- TIMP:** Inhibidor tisular de metaloproteinasas matriciales (de *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*)
- TNF:** Factor de necrosis tumoral (de *Tumor Necrosis Factor*)
- tPA:** Activador de plasminógeno tisular (de *tissue Plasminogen Activator*)
- TSP:** Trombospondina

TXA₂: Tromboxano A₂

uPA: Activador de plasminógeno tipo uroquinasa (de *urokinase-type Plasminogen Activator*)

UV: Ultravioleta

VCAM: Molécula de adhesión de las células vasculares (de *Vascular Cell Adhesion Molecule*)

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular (de *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGFR: Receptor de VEGF (de *VEGF Receptor*)

VHL: Gen supresor de tumores von Hippel Lindau (de *von Hippel Lindau*)

vWF: Factor von Willebrand (de *von Willebrand Factor*)

*Si comienza uno con certezas,
terminará con dudas;
mas si se conforma en comenzar con dudas,
llegará a terminar con certezas*

Francis Bacon (1561-1626)

INTRODUCCIÓN

Nuestro grupo de investigación lleva varios años dedicado al estudio de la endoglina, una glicoproteína de membrana, hasta ahora bastante desconocida, que se expresa fundamentalmente en células endoteliales y está involucrada en la señalización de diversas moléculas de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF)- β . Nuestros resultados y los de otros grupos, demuestran que la endoglina modula las respuestas celulares a TGF- β , entre ellas la producción de componentes de la matriz extracelular.

Además, la endoglina participa de forma importante en la regulación de la angiogénesis, el remodelado vascular y el desarrollo cardiovascular. La mutación de endoglina causa una enfermedad llamada telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), que se caracteriza por una baja expresión endotelial de endoglina así como por alteraciones en la formación de los vasos sanguíneos. Así mismo, los ratones *knockout* para el gen de endoglina mueren durante el desarrollo embrionario debido a hemorragias masivas causadas por la formación deficiente de los vasos sanguíneos. Además, se ha descrito un aumento de la expresión de endoglina en el endotelio de los vasos neoformados en tumores experimentales así como en las propias células tumorales, por lo que la endoglina podría estar involucrada en la angiogénesis tumoral. Por otra parte, entre los numerosos factores que regulan el proceso de angiogénesis se encuentra el TGF- β , el cual juega un papel clave en la neoformación de capilares así como en el mantenimiento de la integridad de la pared de los vasos, tanto en el desarrollo embrionario como en la vida post-natal. En resumen, la endoglina está involucrada en la angiogénesis durante la vida fetal, y existen datos que hacen pensar que podría jugar un papel clave en la angiogénesis del individuo adulto.

Nosotros nos planteamos estudiar la implicación de la endoglina en la angiogénesis del adulto, no sólo por la importancia que puede tener para los enfermos de HHT, sino también por su posible aplicación en el tratamiento o en el retraso en la progresión de muchas enfermedades caracterizadas por tener alterado el proceso de angiogénesis, como es el caso de los tumores cancerosos, la aterosclerosis o algunas enfermedades inflamatorias.

En segundo lugar decidimos abordar el estudio del papel de endoglina durante la reparación de heridas, puesto que en este proceso son fundamentales tanto la angiogénesis como la regulación de la síntesis/degradación de los componentes de la matriz extracelular.

Recientemente hemos demostrado en nuestro laboratorio que la reducción de la expresión de endoglina se asocia a una reducción de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y por consiguiente de los niveles de óxido nítrico (NO). Como esta molécula está involucrada en la regulación de la angiogénesis y la reparación de tejidos, nuestro tercer gran objetivo fue el estudio de la implicación del NO en estos procesos, tanto en condiciones control como en condiciones de deficiencia en la expresión de endoglina.

1. Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de desarrollo de vasos sanguíneos nuevos a partir de los preexistentes. Se trata de un proceso completamente fisiológico que constituye un importante mecanismo biológico de mantenimiento y recuperación del organismo. En condiciones fisiológicas normales, la angiogénesis tiene lugar durante el desarrollo embrionario, en los procesos de cicatrización de heridas, en la restauración del flujo sanguíneo en los tejidos dañados por diferentes causas, en la reconstrucción cíclica del endometrio y en la construcción de la placenta durante el embarazo (Folkman y Shing, 1992). Pero cuando la angiogénesis sufre alguna desregulación, puede formar parte de mecanismos patogénicos esenciales en el desarrollo de enfermedades graves, eventualmente mortales (Folkman, 1993).

1.1. Fisiología de los vasos sanguíneos

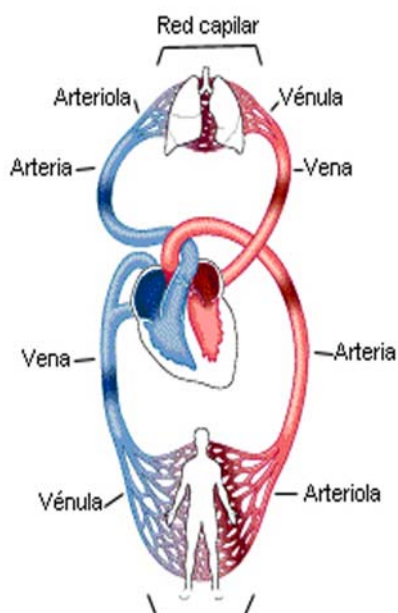


Figura 1. Esquema del sistema cardiovascular.

Los vasos sanguíneos son los responsables del suministro de oxígeno, nutrientes y células del sistema inmune, así como de la retirada de los productos de deshecho de todos los tejidos del organismo. La red vascular se ramifica y organiza espacialmente, para poder llevar a cabo estas funciones adecuadamente. Las grandes arterias que salen desde los ventrículos del corazón van ramificándose y haciéndose más finas hasta que se convierten en capilares, vasos extremadamente finos a través de los cuales se realiza el intercambio gaseoso y de sustancias entre la sangre y los tejidos. Una vez que

este intercambio tiene lugar, los capilares van reuniéndose en vénulas y venas por donde la sangre regresa a las aurículas del corazón (Figura 1). El establecimiento y mantenimiento de la red vascular son requerimientos esenciales para el crecimiento y funcionamiento de todos los órganos y tejidos (Jain, 2003).

La pared de los vasos está formada por células endoteliales (endotelio vascular) y las llamadas células murales, las cuales están rodeadas por matriz extracelular. El origen, número, tipo y organización de las células murales, la composición de la matriz y las conexiones del sistema vascular con el sistema nervioso dependen de la localización del vaso así como de su función (Jain, 2003). Los capilares, los vasos más abundantes en el organismo, están formados por células endoteliales rodeadas por la membrana basal y una capa escasa de pericitos. Las características estructurales y la gran superficie de la pared de los capilares hacen posible el intercambio de nutrientes entre la sangre y los tejidos. Las arteriolas y las vénulas están recubiertas por un mayor número de células murales, en comparación con los capilares. Las arteriolas precapilares adquieren capas concéntricas de células del músculo liso vascular que forman su propia membrana basal y están estrechamente relacionadas con el endotelio. La extravasación de macromoléculas y células desde el torrente sanguíneo ocurre generalmente en las vénulas postcapilares. Las paredes de los grandes vasos la forman tres capas especializadas: una íntima compuesta por células endoteliales, una media de células del músculo liso vascular y una adventicia de fibroblastos. Estas tres capas van acompañadas por la matriz y las láminas elásticas. El músculo liso vascular y las láminas elásticas mantienen el tono del vaso y controlan el flujo sanguíneo (Jain, 2003) (Figura 2).

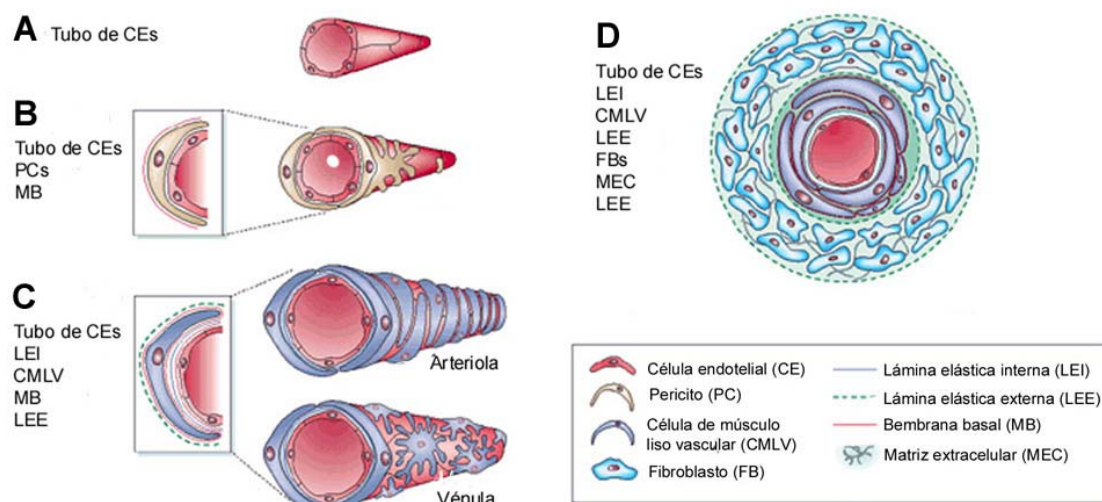


Figura 2. Composición de la pared de los vasos sanguíneos. A. Vaso naciente. **B.** Capilar sanguíneo. **C.** Arteriolas y vénulas. **D.** Arterias y venas (modificado de Jain, 2003).

1.1.1. El endotelio

El endotelio vascular es la barrera de células en monocapa que delimita el lado interno de los vasos sanguíneos. Durante muchos años se pensó que las células endoteliales no tenían ningún papel fisiológico y su única función era la de separar la sangre de los tejidos. Hoy sabemos que el endotelio es un tejido metabólicamente activo que regula numerosas respuestas biológicas así como funciones fisiológicas y tiene además una alta capacidad sintética (Sumpio y cols., 2002).

La estructura e integridad funcional de las células endoteliales es muy importante para el mantenimiento de la pared de los vasos y la función circulatoria. Como se trata de una barrera semipermeable, el endotelio controla la transferencia de moléculas desde el plasma hasta el subendotelio y viceversa. Además el endotelio regula los procesos de trombosis y trombolisis así como la agregación plaquetaria, modula el tono vascular y el flujo sanguíneo y regula las respuestas inmune e inflamatoria mediante el control de la interacción de los leucocitos con la pared de los vasos. Por último, las células endoteliales están muy involucradas en los procesos de remodelado vascular y angiogénesis (Sumpio y cols., 2002). Si

se altera el funcionamiento de las células endoteliales las consecuencias pueden ser muy serias por la aparición de diversas enfermedades, como la arterosclerosis y el cáncer, las dos principales causas de muerte en el mundo occidental (Sumpio y cols., 2002).

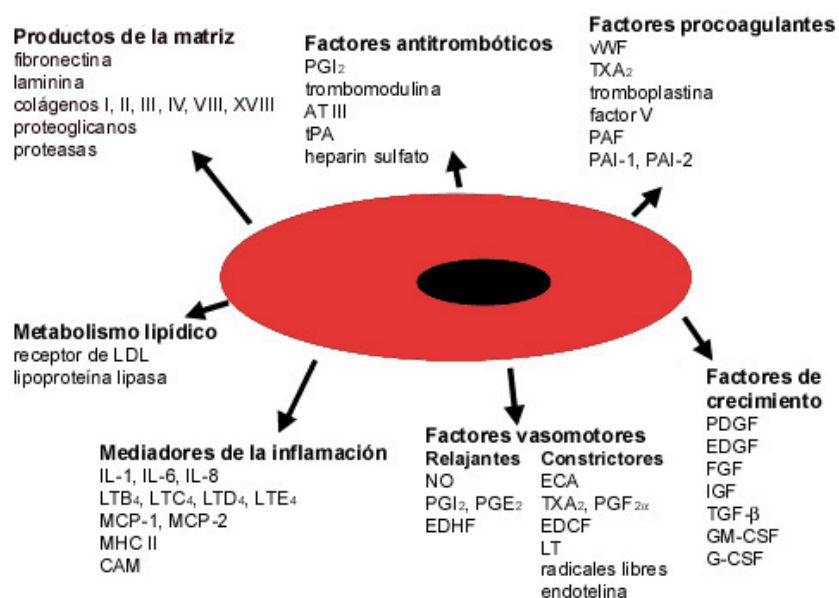


Figura 3. Productos secretados/excretados por la célula endotelial relacionados con la fisiología del vaso (modificado de Sumpio y cols., 2002).

Las células endoteliales también tienen funciones específicas dependiendo de su localización. El endotelio se caracteriza por su heterogenicidad tanto morfológica como funcional, que se manifiesta a diferentes niveles: podemos diferenciar el comportamiento entre micro y macro células endoteliales vasculares, así como entre las células aisladas en órganos diferentes e incluso en zonas distintas de un mismo órgano. Además, el endotelio arteriolar es muy diferente del venoso. La variación fenotípica hace que las células endoteliales expresen diferentes marcadores y no respondan de igual modo a los mismos estímulos (Kuzu y cols., 1992).

Las células endoteliales se comunican entre sí y también con otras células tanto de dentro como de fuera del lumen del vaso. Cuando se producen cambios en el flujo o la presión de la sangre, se generan señales en las células endoteliales que llegan tanto al citoesqueleto interno de las

células, como a la matriz extracelular que las rodea. En los vasos quiescentes, hay moléculas (caderinas, claudinas, ocludinas, conexinas, molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria (PECAM)) entre las células endoteliales que mantienen las uniones celulares estableciendo la barrera permeable entre la sangre y el tejido. Además de esta función mecánica, estas moléculas transmiten señales fundamentales para la supervivencia del endotelio (Carmeliet y cols., 1999).

Generalmente las células endoteliales se encuentran en estado quiescente. Tienen un ciclo celular que varía desde meses hasta años, a excepción de las células endoteliales del endometrio y de los tumores sólidos, cuyo ciclo es de semanas. Sin embargo, cuando el endotelio sufre algún daño, las células endoteliales cambian su fenotipo para poder migrar y proliferar, con el fin de reparar la lesión en el menor tiempo posible (Bachetti y Morbidelli, 2000).

1.2. Secuencia de eventos en la angiogénesis

El complejo proceso de la angiogénesis involucra a los productos de muchos genes que son expresados por diferentes tipos celulares, y todos ellos contribuyen a una secuencia de eventos integrada (Conway y cols., 2001) (Figura 4).

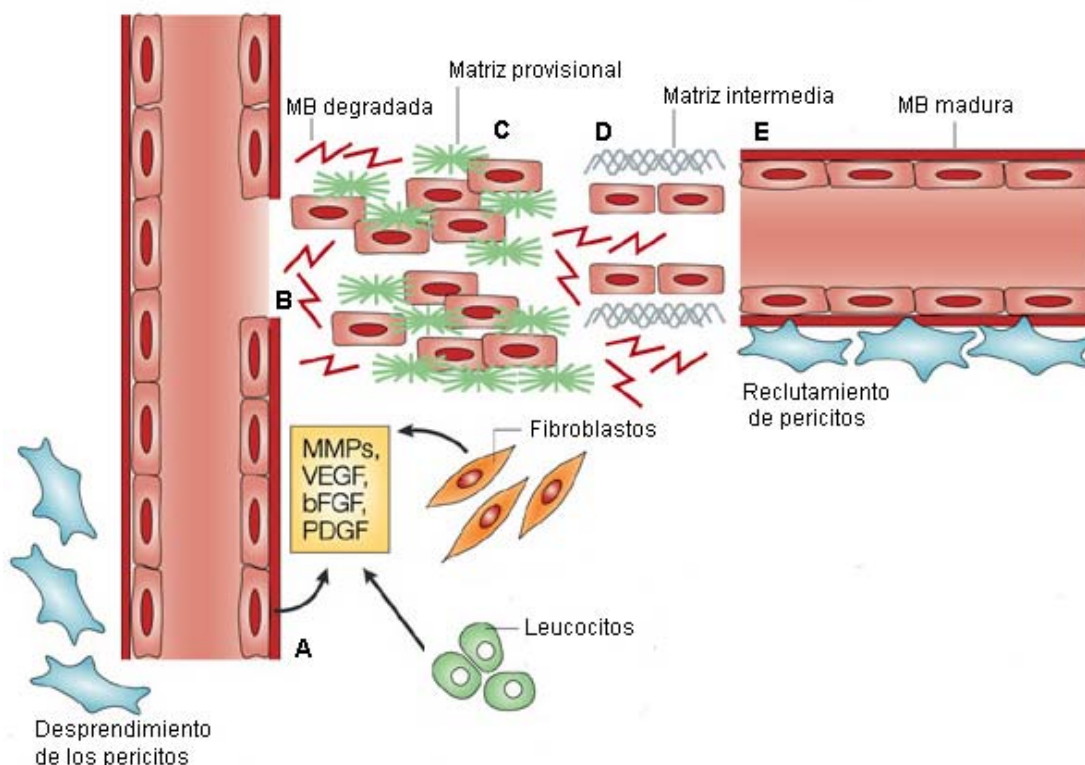


Figura 4. Cascada de eventos en la angiogénesis. MB: membrana basal. MMPs: metaloproteinasas matriciales. **A.** Producción y liberación de factores angiogénicos y su unión a los receptores de membrana en las células endoteliales. **B.** Degradación de la membrana basal **C.** Proliferación y migración de las células endoteliales. **D.** Formación de tubos de células endoteliales. **E.** Maduración del vaso (modificado de Kalluri, 2003).

1.2.1. Fase de activación: inducción de la respuesta angiogénica

El proceso comienza con la producción y liberación de una serie de factores proangiogénicos (Figura 4A y 5), como respuesta a un proceso de hipoxia o isquemia provocado por un daño o una anomalía. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es, de entre estos factores, el que más importancia tiene en el inicio de la angiogénesis, por su capacidad de inducir vasodilatación al producir óxido nítrico (NO) endotelial y porque aumenta la permeabilidad vascular de las células endoteliales (Ziche y cols., 1997). Con el incremento de la permeabilidad vascular, los factores proangiogénicos difunden a los tejidos próximos y se unen a receptores específicos situados sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos cercanos a dichos tejidos. La unión de los factores proangiogénicos con sus

receptores provoca una transición en las células endoteliales desde un estado quiescente a un estado activado o angiogénico. Probablemente, se produzcan cambios morfológicos en las células endoteliales que conllevan un decremento en el estado de confluencia, lo que permite que las células se vuelvan susceptibles a la mitogénesis (Folkman, 1997). Este cambio en el endotelio da lugar a la producción de una serie de enzimas como las metaloproteinasas matriciales que disuelven algunas zonas de la membrana basal que rodea a los vasos sanguíneos (Folkman y D'Amore, 1996) (Figura 4B). Las metaloproteinasas son producidas por muchos tipos celulares, como células epiteliales, fibroblastos, células inflamatorias y células endoteliales. Por otra parte, los activadores de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y tisular (tPA) convierten el plasminógeno, proteína filtrada desde el plasma, en plasmina. La plasmina es una proteasa que degrada fibronectina, laminina y proteoglicanos y además activa ciertas metaloproteinasas (Griffioen y Molema, 2000).

1.2.2. Fase de progresión: proliferación y migración de las células endoteliales

La degradación de la membrana basal vascular supone la liberación de las células endoteliales de sus anclajes de membrana (integrinas), lo que les permite migrar y proliferar a través de los huecos creados en la membrana basal hacia el tejido dañado o anómalo (Figura 4C). Con la degradación de la membrana basal también se liberan factores de crecimiento (VEGF y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)) secuestrados por la matriz y se desligan los pericitos que rodean y sostienen la pared del vaso. Además se crea una matriz provisional (fibronectina, vitronectina, fibrina, colágeno I, trombina...) que guía a las células endoteliales en su migración. Muchos de los factores de crecimiento proangiogénicos inducen a las células endoteliales a producir las moléculas que componen esta matriz provisional (Eliceiri y Cheresch, 2001).

Las células endoteliales que han migrado se enrollan sobre sí mismas, formando un tubo, a modo de capilar sanguíneo muy elemental (Figura 4D). Las integrinas actúan como puntos de unión con la matriz

extracelular, facilitando el brote del nuevo vaso sanguíneo. Además, se producen metaloproteinasas matriciales, cuya misión es disolver el tejido que está delante del nuevo vaso que se está formando, facilitando con ello su penetración y acomodación. A medida que el nuevo vaso sanguíneo crece longitudinalmente, el tejido experimenta una remodelación, disponiéndose alrededor del vaso.

1.2.3. Fase de resolución: terminación y maduración

Cuando los nuevos vasos formados se conectan entre sí y con el circuito sanguíneo principal comienza la resolución del proceso: se inhibe la migración y la proliferación de las células endoteliales y se reconstituye la membrana basal. Pero el establecimiento de una red vascular funcional requiere la maduración de los nuevos vasos. La maduración incluye el reclutamiento de células murales, el desarrollo de matriz extracelular y las láminas elásticas y la especialización órgano-específica de las células endoteliales, células murales y matriz. La asociación de pericitos y células del músculo liso vascular a los nuevos vasos formados regula la proliferación, supervivencia, migración, diferenciación, formación de ramificaciones, flujo sanguíneo y permeabilidad vascular de las células endoteliales. La especialización tejido u órgano-específica de los vasos sanguíneos es la fase peor entendida de la angiogénesis. Este proceso incluye la determinación arterial o venosa del vaso, la formación de uniones entre las células, y la diferenciación de las células endoteliales para formar estructuras capilares órgano-específicas (Jain, 2003) (Figuras 4E y 12).

1.3. Control fisiológico de la angiogénesis

Es obvio que un proceso tan complejo como la angiogénesis esté sujeto a un estrecho control. La proliferación descontrolada de vasos sanguíneos acabaría con el propio organismo.

La regulación de la angiogénesis se lleva cabo mediante la producción y liberación de diversos factores estimulantes e inhibidores (Figura 5), que varían según la condición fisiológica o patológica y el tipo de tejido. Entre

estos factores que regulan el crecimiento endotelial se incluyen factores de crecimiento, citoquinas, quimoquinas, mediadores lipídicos, hormonas y neuropéptidos que actúan directa o indirectamente sobre las células endoteliales. En condiciones de normalidad fisiológica, los estimulantes y los inhibidores de la angiogénesis se encuentran en un perfecto equilibrio, roto en alguno de los sentidos cuando las circunstancias orgánicas así lo exigen, aunque en ocasiones tales circunstancias favorezcan el deterioro del propio organismo, como ocurre con los tumores cancerosos (Folkman, 1993).

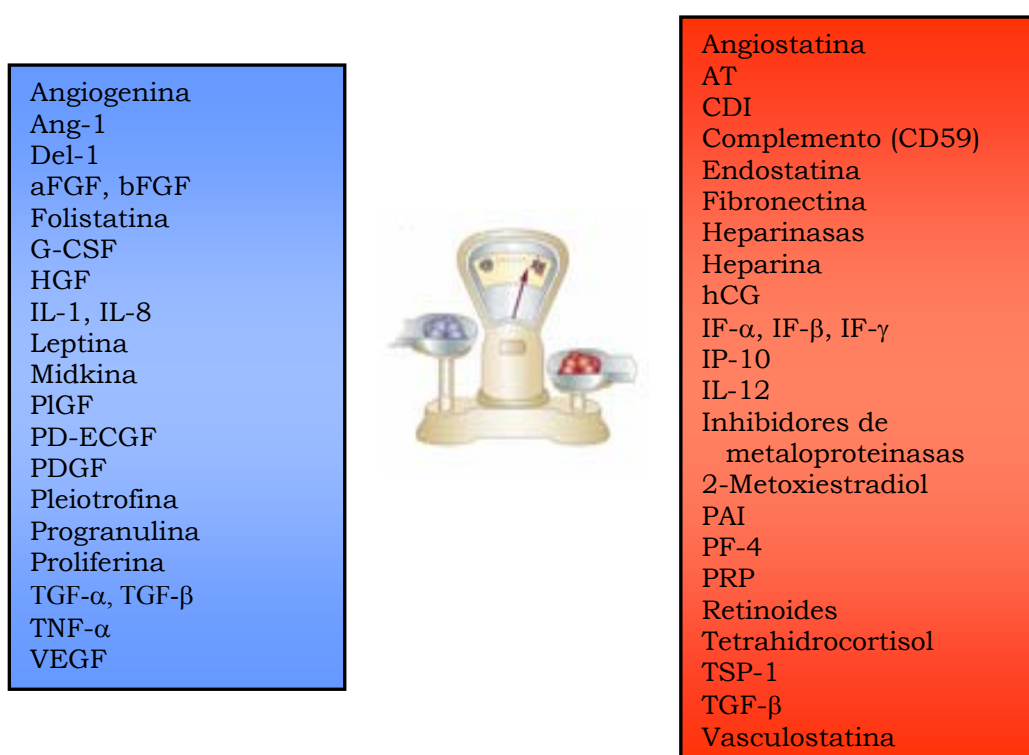


Figura 5: Principales factores fisiológicos reguladores de la angiogénesis.

(■) Factores pro-angiogénicos. (■) Factores inhibidores de la angiogénesis.

1.3.1. Hipoxia / Factores inducibles por hipoxia

La hipoxia es el principal estímulo de expansión de la red vascular. Inicialmente las células se oxigenan por difusión simple, pero con el crecimiento de los tejidos se produce un límite en la difusión del oxígeno, y es el estado de hipoxia el que provoca el crecimiento de los vasos, por

señalización celular a través de los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) (Pugh y Ratcliffe, 2003).

Los HIF son $\alpha\beta$ -heterodímeros que regulan numerosas respuestas celulares y sistémicas a la hipoxia (Wenger, 2002). Ambas subunidades HIF- α y HIF- β tienen varias isoformas. Mientras las subunidades HIF-1 β son proteínas nucleares constitutivas, las HIF- α son inducibles por la hipoxia. HIF-1 α y HIF-1 β interactúan con elementos de respuesta a la hipoxia que inducen actividad transcripcional (Wiesener, 1998). Sin embargo, HIF-3 α está involucrado en la regulación negativa de esta respuesta (Makino y cols., 2001). En las células oxigenadas se producen reacciones de hidroxilación que suponen un mecanismo de inactivación de HIF e inhibición de su actividad transcripcional. En condiciones de hipoxia, HIF se escapa de esta inactivación, debido a la dependencia de oxígeno que tienen dichas hidroxilasas (Pugh y Ratcliffe, 2003). Estudios recientes han puesto de manifiesto el papel crucial del producto del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (VHL) en las respuestas a la hipoxia dependientes de HIF-1 (Mole y cols., 2001) (Figura 6).

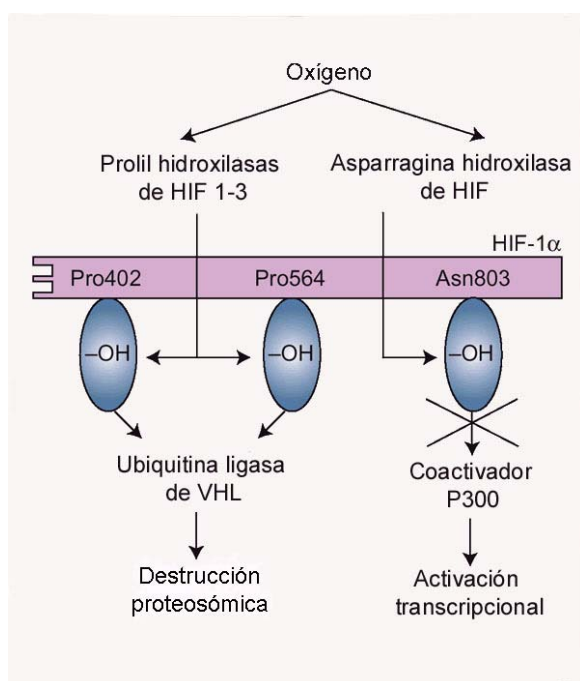


Figura 6. Regulación de HIF-1. Los sitios de hidroxilación corresponden al polipéptido HIF-1 α humano. En las células oxigenadas, la hidroxilación de dos residuos de prolina media la interacción con el complejo ubiquitina ligasa de VHL que desencadena la destrucción proteosómica de HIF-1 α . Una segunda hidroxilación en un residuo de asparragina bloquea la interacción de HIF-1 α con el coactivador transcripcional P300 (modificado de Pugh y Ratcliffe, 2003).

Además, la hipoxia regula otras rutas transcripcionales como las de fos y jun (Webster y cols., 1994), factor nuclear (NF)- κ B (Koong y cols., 1994) y proteína p53 (Alarcon y cols., 1999).

Como respuesta a la hipoxia se activan numerosos genes involucrados en las diferentes fases de la angiogénesis: la óxido nítrico sintasa (NOS), factores de crecimiento (VEGF, angiopoyetinas, FGF...) y sus receptores (VEGFR), metaloproteinasas matriciales, receptores e inhibidores del activador de plasminógeno... Muchos de estos genes se transcriben directa o indirectamente a través de la ruta de HIF (Pugh y Ratcliffe, 2003).

1.3.2. Ligandos y receptores

1.3.2.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular

Los HIF regulan muchos genes angiogénicos, pero la inducción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es quizás la más importante (Ferrara y cols., 2003). La señalización a través de VEGF representa un paso crítico en la angiogénesis fisiológica y también parece ser importante en la patológica, ya que se le asocia con el crecimiento de tumores.

El VEGF (también llamado VEGFA) pertenece a una familia génica que además incluye al factor de crecimiento placentario (PlGF), VEGFB, VEGFC y VEGFD (Figura 7). Se han descrito actividades similares a las de VEGF en sus homólogos (Ferrara y Davis-Smyth, 1997). Los factores VEGFC y VEGFD regulan la angiogénesis linfática, lo cual enfatiza la importancia de esta familia en el control del crecimiento y diferenciación de muchos de los componentes anatómicos del sistema vascular (Karkkainen y cols., 2002). Dependiendo del número de aminoácidos, existen cuatro isoformas diferentes de VEGF: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. El VEGF₁₆₅, la isoforma predominante (Neufeld y cols., 1999), es una glicoproteína homodimérica con alta afinidad por la heparina (Ferrara y Henzel, 1989). Cuando se secreta, una fracción importante permanece unida a la matriz extracelular (Park y cols., 1993). La pérdida del dominio de afinidad a la heparina (VEGF₁₂₁) significa la pérdida de la actividad

mitógena de VEGF (Keyt y cols., 1996). Además, se ha demostrado que son las isoformas con alta afinidad por la heparina las que estimulan de una manera esencial el inicio de la formación de ramificaciones vasculares (Ruhrberg y cols., 2002).

El VEGF se produce fundamentalmente en células tumorales bajo condiciones de hipoxia, macrófagos y otras células del sistema inmune (Figura 7). Además de producir vasodilatación (Ku y cols., 1993) y aumentar la permeabilidad vascular (Dvorak y cols., 1995), el VEGF induce la expresión de proteasas cruciales en la invasión celular y la remodelación tisular (Ferrara y Keyt, 1997). *In vitro*, el VEGF promueve el crecimiento de células endoteliales vasculares derivadas de arterias, venas y vasos linfáticos (Ferrara y Davis-Smyth, 1997). Además el VEGF induce una potente respuesta angiogénica en varios modelos *in vivo* (Leung y cols., 1989; Plouet y cols., 1989). El VEGF se comporta como un factor de supervivencia de las células endoteliales tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, previene la apoptosis inducida por la depleción de suero (Gerber y cols., 1998 a y b) mientras que *in vivo*, su inhibición produce apoptosis en las células vasculares del ratón neonato, aunque no en las del adulto (Gerber y cols., 1999).

Muchos factores de crecimiento, entre los que se incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), TGF- α , TGF- β , el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento tipo insulina (IGF)-1, FGF y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)-BB regulan la expresión del ARN mensajero de VEGF, lo que sugiere que la liberación autocrina o paracrina de estos factores colabora con la hipoxia local en la regulación de la liberación de VEGF. Además, determinadas citoquinas inflamatorias como la interleuquina (IL)-1 α e IL-6, inducen la expresión de VEGF en determinados tipos celulares, lo que concuerda con la hipótesis de que el VEGF puede ser un mediador de la angiogénesis y de la permeabilidad en enfermedades inflamatorias (Neufeld y cols., 1999). Por otra parte, también se ha demostrado la inducción de la expresión del gen de VEGF por mutaciones oncogénicas y por la vía de Ras (Grugel y cols., 1995; Okada y cols., 1998).

El VEGF se une a dos receptores tirosina-quinasa: receptor de VEGF (VEGFR)-1 (también llamado tirosina-quinasa tipo fms (Flt)-1) y VEGFR-2 (también llamado región de dominio quinasa (KDR) o quinasa tipo fms (Flk)-1) (Shibuya y cols., 1990; Terman y cols., 1991). Existe otro receptor en esta familia (VEGFR-3 o Flt-4), al cual no se une el VEGF pero sí VEGFC y VEGFD (Karkkainen y cols., 2002). Además, el VEGF se une a las neuropilinas, una familia de co-receptores. El papel de los diferentes receptores de VEGF se resume en la Figura 7.

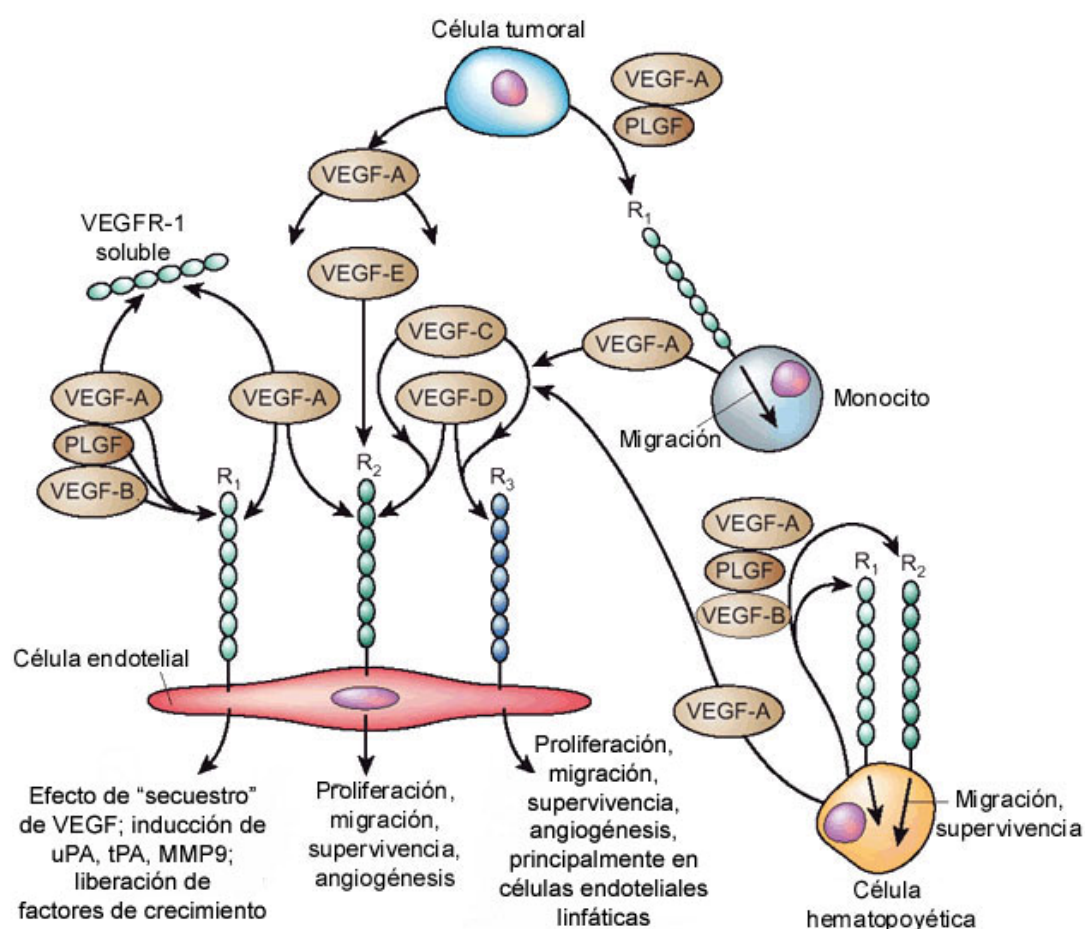


Figura 7. Papel de VEGF y sus receptores tirosina-quinasa en los diferentes tipos celulares. Mientras VEGFR-1 y VEGFR-2 se expresan en la superficie de las células endoteliales sanguíneas, el VEGFR-3 sólo se encuentra en las células endoteliales linfáticas. VEGFA se une a VEGFR-1 y VEGFR-2. Sin embargo PLGF y VEGFB interaccionan sólo con VEGFR-1. El VEGFE (derivado del virus orf) es un agonista selectivo de VEGFR-2. VEGFC y VEGFD se unen a VEGFR-2 y VEGFR-3. El VEGFR-2 es el principal mediador de mitogénesis, supervivencia, angiogénesis y permeabilidad microvascular. Por el contrario, a través de VEGFR-1 no se producen señales mitogénicas en las células endoteliales, especialmente durante el desarrollo embrionario, por lo que su papel es inhibitorio al secuestrar el VEGF y evitar su unión con VEGFR-2 (modificado de Ferrara y cols., 2003).

1.3.2.2. Factores de crecimiento fibroblástico

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) son moléculas proangiogénicas directas. El FGF básico (bFGF) aparece bajo dos formas, una de bajo peso molecular (18 kDa) y otra de alto peso molecular (22-24 kDa). Durante la angiogénesis, la forma de bajo peso molecular se une al endotelio e induce motilidad y proliferación celular, aumenta la actividad de las proteasas y modula los niveles de integrinas. La forma de alto peso molecular puede actuar sobre la proliferación de las células endoteliales después de su translocación al núcleo (Gleizes y cols., 1995). El bFGF está normalmente inactivo debido a su unión a los heparán sulfato proteoglicanos de la matriz extracelular. Algunas proteínas, con capacidad de unión a bFGF, liberan este factor de la matriz extracelular, para que se vuelva activo y pueda mediar sus funciones biológicas (Klein y cols., 1997). Por otra parte, el FGF ácido (aFGF), ha sido implicado en la formación de tubos a partir de las células endoteliales (Kanda y cols., 1996).

1.3.2.3. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)-BB es secretado por las células endoteliales, presumiblemente en respuesta a VEGF y facilita el reclutamiento de las células murales. La señalización de PDGF-BB se produce a través de su receptor PDGFR- β , el cual se localiza en las células murales, siendo este el proceso responsable de la proliferación y migración de estas células durante la fase de maduración de los vasos. Cuando las células murales que se reclutan son insuficientes se produce crecimiento desmesurado de las células endoteliales, permeabilidad, elongación excesiva y fragilidad de los vasos, sangrados e hipoxia (Hellstrom y cols, 2001). El subsiguiente aumento de VEGF aumenta la permeabilidad vascular y el edema, lo que provoca la formación de hemangiomas.

1.3.2.4. Receptor esfingolípido de diferenciación endotelial acoplado a proteínas G-1

La señalización a través del receptor esfingolípido de diferenciación endotelial acoplado a proteínas G-1 (EDG1), expresado en las células murales, también produce el reclutamiento de estas células en la maduración de los vasos sanguíneos (Kluk y Hla, 2002). Por otra parte, la falta de este receptor puede alterar la producción de matriz extracelular por parte de las células endoteliales o la interacción entre las células endoteliales y las células murales, e interferir así en la maduración de los vasos.

1.3.2.5. Angiopoyetina 1/Angiopoyetina 2/Tie-2

Otro sistema de señalización involucrado en el mantenimiento, crecimiento y estabilización de los vasos es el receptor Tie-2, al cual se unen las angiopoyetinas. Las principales fuentes de angiopoyetina (Ang)-1 y Ang-2 son las células murales y las células endoteliales respectivamente. La Ang-1 activa Tie-2, mientras que la Ang-2 lo activa en algunos tipos celulares y lo bloquea en otros. La Ang-1 se comporta como estimulante de la supervivencia de las células endoteliales y moviliza a células progenitoras de células endoteliales y a las células madre hematopoyéticas (Hattori y cols., 2001), pero también inhibe la angiogénesis en tumores y en el corazón (Visconti y cols., 2002). Se cree que el efecto antiangiogénico de Ang-1 se debe al efecto de esta molécula sobre la integridad del vaso, ya que no permite que las células endoteliales se liberen para poder migrar y ramificarse (Thurston y cols., 2000). La Ang-2 estimula el crecimiento de vasos inmaduros (pobres en músculo liso vascular) de tumores, ya que rompe las interacciones entre las células endoteliales y las células periendoteliales, degrada la matriz extracelular y antagoniza el efecto de Ang-1 (Gale y cols., 2002). La Ang-2 también tiene actividad angiogénica: su efecto es sinérgico al de VEGF (Visconti y cols., 2002); sin embargo, si las señales angiogénicas son insuficientes, provoca apoptosis de las células endoteliales y regresión de los vasos (Hackett y cols., 2002).

1.3.2.6. Factor de crecimiento transformante β 1

Los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF)- β (activinas, inhibinas, proteínas morfogénicas del hueso (BMP), factores de crecimiento y diferenciación (GDF)), y en particular TGF- β 1, están implicados en varias fases de la angiogénesis.

El TGF- β forma parte de una superfamilia de polipéptidos extracelulares con ciertas características estructurales comunes, que se encuentran presentes en una gran variedad de organismos y que participan en procesos de crecimiento, desarrollo, diferenciación y homeostasis a través de su interacción con receptores de membrana. En esta superfamilia se incluyen más de treinta proteínas de mamíferos, siendo los componentes de la familia del TGF- β los miembros prototipo (Massagué, 1998). Hasta ahora se han caracterizado tres isoformas diferentes de TGF- β en mamíferos (TGF- β 1, 2 y 3), aunque el TGF- β 1 es la isoforma más abundante (Roberts y Sporn, 1990). Los TGF- β están implicados en procesos de desarrollo y diferenciación, inhiben el crecimiento de células epiteliales y endoteliales, así como las funciones inmune y hematopoyética, promueven el crecimiento del tejido conectivo, favorecen la quimiotaxis de fibroblastos, macrófagos y linfocitos y estimulan los procesos de reparación de tejidos. También están implicados en procesos patológicos, como son la producción excesiva de matriz extracelular, que desencadena fibrosis tisular, y la síntesis de otros factores de crecimiento (Sporn y Roberts, 1992).

El TGF- β es secretado por las células o purificado por las plaquetas como un complejo latente de alto peso molecular. Este complejo latente está formado por el péptido maduro (homodímero de la porción carboxi-terminal del propéptido de 25 KDa) que se asocia por una unión no covalente con el péptido asociado de latencia (LAP) (dímero de la porción amino-terminal del propéptido). Esta molécula recibe el nombre de “complejo latente pequeño”. En ocasiones, al complejo latente pequeño se une la proteína conocida como proteína de unión al TGF- β latente (LTBP) mediante un puente disulfuro, y al complejo resultante se le conoce como “complejo latente largo” (Figura 8). El LTBP se une de forma covalente a la matriz extracelular, proporcionando un importante reservorio de TGF- β inactivo

(Koli y cols., 2001). En la activación del TGF- β (liberación del TGF- β activo del complejo latente) intervienen numerosos factores relacionados con el entorno de la célula como son el pH, estrés, temperatura y las enzimas proteolíticas. La movilización de los reservorios de TGF- β de la matriz extracelular representa uno de los puntos más importantes de la regulación de su actividad, ya que es aquí donde se controla la concentración local de TGF- β activo, es decir, con acceso a los receptores señalizantes (Miyazono y cols., 1993; Barcellos-Hoff, 1996).

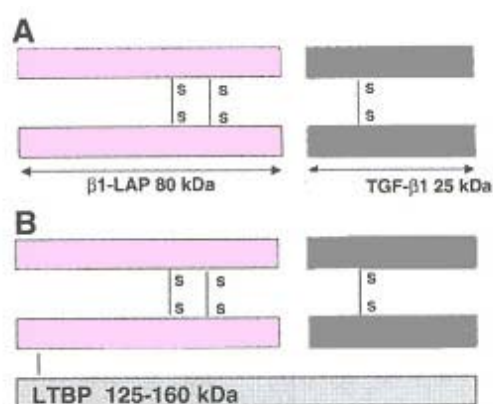


Figura 8. Estructura y formas latentes del TGF- β 1. A. Complejo latente pequeño. B. Complejo latente largo (modificado de Schnaper y cols., 2003).

Los TGF- β producen sus efectos biológicos a través de su unión a receptores de membrana serina-treonina-quinasas de tipo I y II (Figura 9). Cada ligando perteneciente a la superfamilia del TGF- β se une a un tipo específico de ambos receptores; en el caso del TGF- β los receptores más abundantes son el receptor de TGF- β (T β R)-I y T β R-II (Derynck y Feng, 1997). Los receptores tipo I han recibido varias nomenclaturas; cuando se descubrieron se les adjudicó la nomenclatura ALK (receptor de activina tipo quinasa), pero posteriormente adoptaron otra nomenclatura que hace referencia a su ligando fisiológico. Así, al T β R-I también se le conoce como ALK-5. ALK-1 es otro receptor tipo I, que une TGF- β , aunque más débilmente que ALK-5. Es posible que ALK-1 sea un receptor específico de las células endoteliales, ya que hasta el momento sólo se ha visto expresado de manera abundante en este tipo celular (Derynck y Zhang, 2003).

La señalización comienza cuando el TGF- β estimula al receptor tipo II, y este a su vez recluta el receptor tipo I, y se forma así un complejo

ternario estable. El receptor tipo II está autofosforilado y por tanto constitutivamente activo. Después del reclutamiento, este receptor fosforila al receptor tipo I, que no está fosforilado en ausencia del ligando. La fosforilación se produce en una región rica en residuos serina-treonina que se encuentra en el “dominio GS”, un dominio cercano a la membrana altamente conservado (Wrana y cols., 1994; Wieser y cols., 1995). A continuación el receptor tipo I media la activación de la cascada de señalización intracelular (Figura 9).

El acceso de TGF- β a los receptores es un proceso estrechamente controlado por diversas proteínas. Parece ser que es ésta la función de los llamados receptores no señalizantes, otro tipo de receptores que no participan en la señalización de TGF- β . Estos receptores son el betaglicano y la endogлина.

El betaglicano o receptor de tipo III es un proteoglicano transmembrana con un dominio citoplasmático corto, con capacidad de unir las tres isoformas de TGF- β , aunque tiene una mayor afinidad por TGF- β 2. El betaglicano no participa en la transducción de la señal, pero en muchos tipos celulares se ha comprobado que potencia los efectos de TGF- β , por lo que parece que actúa presentando el ligando a los receptores señalizantes. Por otro lado, la forma soluble de betaglicano se comporta como antagonista de los efectos de TGF- β (López-Casillas y cols., 1994).

La endogлина es una glicoproteína de membrana con gran homología estructural al betaglicano en las regiones transmembrana e intracelular y que se expresa fundamentalmente en el endotelio vascular (Cheifetz y cols., 1992). Se ha demostrado que la endogлина actúa como un receptor tipo III, facilitando la unión de TGF- β 1 y TGF- β 3 al receptor tipo II (Letamendía y cols., 1998 a; Barbara y cols., 1999), pero su papel en la señalización está menos claro. Puesto que este trabajo se basa en el estudio de esta proteína, hablaremos de ella detenidamente más adelante.

La señal desde los receptores serina-treonina-quinasa al núcleo se transmite a través de las Smads (*Small mothers against decapentaplegic*), unas proteínas intracelulares de 50-70 kDa (Massagué, 1998; Heldin y cols., 1997; Attisano y Wrana, 1998; Whitman, 1998; Christian y

Nakayama, 1999) (Figura 9). Mediante estudios realizados en diversas especies se han identificado tres tipos de Smads: Smads reguladas por receptor (R-Smads), Smads mediadoras comunes (Co-Smads) y Smads inhibitoras (I-Smads). En el estado basal, las R-Smads (Smad 2 y Smad 3 en el caso de ALK-5; Smad 1 y Smad 5 en el caso de ALK-1) permanecen en el citoplasma unidas a las proteínas SARA (anclaje de las Smads para la activación del receptor) (Tsukazaki y cols., 1998; Wu y cols., 2000). Las R-Smad son fosforiladas por el receptor tipo I en un motivo carboxi-terminal altamente conservado (SSXS). Las proteínas SARA son las encargadas de poner en contacto a las R-Smads con el receptor tipo I para que se produzca esta fosforilación. Una vez fosforiladas, las R-Smad forman complejos heteroméricos con las Co-Smads, de las cuales sólo se conoce un miembro en mamíferos: Smad 4 (Lagna y cols., 1996). El complejo R-Smad/Co-Smad se transloca al núcleo, donde es capaz de regular la transcripción de determinados genes (Miyazono, 2000). Los mecanismos de regulación utilizados por el complejo de las Smads son tres: unión directa a secuencias específicas de ADN, interacción con otras proteínas de unión al ADN y reclutamiento de co-activadores o co-represores transcripcionales. Las I-Smad (Smad 6 y Smad 7 en la señalización de TGF- β) impiden el acceso de las R-Smads al complejo de receptores, o la formación del complejo R-Smad/Co-Smad. La expresión de las I-Smads es inducida por TGF- β proporcionando una regulación negativa de su mecanismo de señalización (Nakao y cols., 1997; Hanyu y cols., 2001). Además, las proteínas Smads pueden interaccionar con algunos factores de transcripción, entre los que se encuentran FAST, AP-1, Sp1, HIF-1, que permiten la activación o la supresión de genes (Attisano y Wrana, 2000; Massagué y Wotton, 2000; Sánchez-Elsner y cols, 2001).

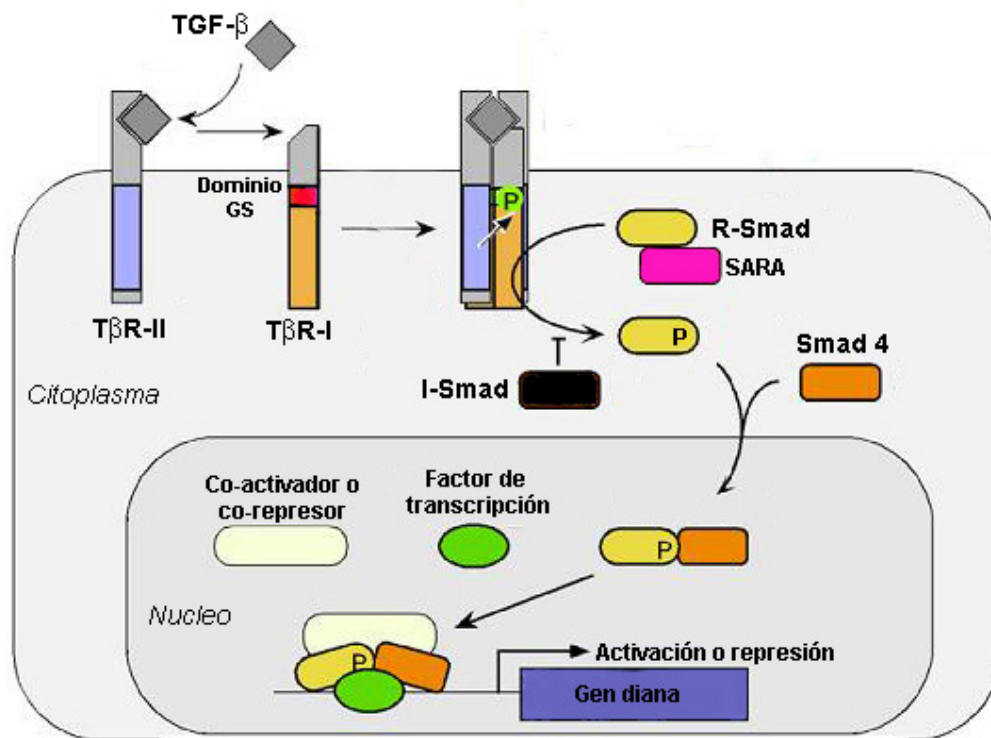


Figura 9. Señalización de TGF-β a través de proteínas Smads. La unión de TGF-β al TβR-II genera la formación de un complejo ligando-receptor que desencadena la activación del TβR-I. El TβR-I activado (P) fosforila las R-Smads. Smad 4 forma complejos con las R-Smad fosforiladas. Estos complejos traslocan al núcleo, donde cooperan con otros factores para la regulación de la transcripción de los genes diana (modificado de Liu, 2003).

Las Smads son los sustratos de los receptores de TGF-β mejor estudiados y representan la vía clásica de señalización. Sin embargo, hoy se sabe que existen otras rutas de señalización implicadas en las respuestas celulares a TGF-β. Una de las rutas que más se ha relacionado con la vía de señalización de TGF-β es la de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK). Las MAPK pertenecen a una familia de proteínas serina-treonina-quinasa que constituyen una vía de señalización ampliamente utilizada en células eucariotas implicadas en respuestas celulares tan importantes como la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Estas proteínas, muy conservadas a lo largo de la evolución, conducen estímulos extracelulares hasta las dianas efectoras dentro de la célula a través de receptores y fosforilaciones secuenciales de enzimas. (Schenk y Snaar-Jagalska, 1999; Paul y cols., 1997; Robinson y Cobb,

1997; Garrington y Johnson, 1999). Las investigaciones llevadas a cabo *in vitro* han demostrado que el TGF- β puede activar los tres tipos de MAPK más estudiados: Las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las quinasas Jun amino-terminal (JNK) y la proteína quinasa de 38 kDa activada por mitógenos (p38 MAPK), aunque la activación depende en gran medida del tipo celular y de las condiciones experimentales empleadas (Chatani y cols., 1995; Hartsough y Mulder, 1997).

A pesar de las controversias en la interpretación de los estudios de angiogénesis y TGF- β , existen datos genéticos tanto en hombre como en ratón que demuestran el papel de esta citoquina en el ensamblaje vascular del embrión y en el mantenimiento de la integridad de la pared de los vasos. Los miembros de la superfamilia de TGF- β , y en particular TGF- β 1, contribuyen en las fases de resolución y maduración de la angiogénesis, estimulando la producción de matriz extracelular e induciendo la diferenciación de células mesenquimales en células murales (Pepper, 1997). Se han descrito propiedades tanto angiogénicas como antiangiogénicas de TGF- β 1, a través de las células endoteliales y de otros tipos celulares. A dosis bajas, el TGF- β 1 contribuye en el inicio de la angiogénesis aumentando la producción de factores angiogénicos y proteasas. A dosis altas, el TGF- β 1 inhibe el crecimiento de las células endoteliales, promueve la formación de la membrana basal y estimula la diferenciación y reclutamiento de las células del músculo liso vascular (van den Driesche y cols., 2003). Algunos receptores de TGF- β 1 (ALK-1, T β R-II, endogлина), así como algunas moléculas implicadas en su señalización (Smad 5) han sido relacionadas tanto con la fase inicial de la angiogénesis como con la fase de maduración (Pepper, 1997; Weinstein y cols., 2000). Estudios recientes *in vitro* indican que la vía de señalización de TGF- β 1 a través de ALK-1 induce la expresión de Id1 en células endoteliales y fibroblastos, una proteína implicada en los procesos de migración y proliferación. En cambio, la vía de señalización a través de ALK-5 induce la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI)-1 en las células endoteliales. El PAI-1 promueve la maduración de los vasos al prevenir la degradación de la matriz provisional formada a su alrededor. Estos hechos hacen pensar que el balance en la señalización a través de una u otra vía es lo que determina

el efecto angiogénico o antiangiogénico de TGF- β 1. La endoglina podría ser una de las moléculas que module este balance (Goumans y cols., 2002; Lebrin y cols., 2004).

1.3.3. Moléculas de interacción célula-célula

Cuando las células endoteliales migran durante la formación de nuevos vasos, las moléculas que mantienen las uniones celulares (caderinas, claudinas, ocludinas) desaparecen, pero más tarde se reestablecen, una vez que se estabiliza el nuevo vaso. El VEGF afloja estos contactos entre las células endoteliales, mientras que la Ang-1 los refuerza (Thurston y cols., 2000).

Las células endoteliales también contactan entre sí a través de PECAM y de uniones tipo Gap, mediante conexinas. Estas uniones también son cruciales tanto para la formación como para el mantenimiento de los vasos (Simon y McWhorter, 2002).

1.3.4. Moléculas de interacción célula-matriz extracelular

La matriz extracelular también regula el proceso de formación de nuevos vasos. En los vasos quiescentes, las células endoteliales tienen una membrana basal (compuesta fundamentalmente por colágeno IV y laminina) y una matriz intersticial (colágeno I y elastina), que da viscoelasticidad y resistencia a la pared del vaso. En este estado, ciertos dominios de las proteínas constituyentes de la membrana basal interactúan con las células endoteliales, generando señales que inhiben la proliferación y protegen las uniones entre las células (Form y cols., 1986). Cuando se desencadena la angiogénesis, las células endoteliales interactúan con diferentes dominios de esas mismas proteínas de la membrana basal, con lo cual la matriz altera su composición y las células endoteliales migran para formar nuevos vasos (Hangai y cols., 2002; Kalluri, 2003). Por lo tanto, las proteínas de la membrana basal, dependiendo de su configuración, influyen

de modo diferente en las células endoteliales y promueven distintas fases del proceso angiogénico.

La remodelación de la matriz extracelular durante la angiogénesis es llevada a cabo por proteasas, entre las que se incluyen activadores de plasminógeno, metaloproteinasas matriciales, heparinasas, quimasas, triptasas y catepsinas (Jackson, 2002). Las proteasas facilitan la formación de nuevos vasos al liberar activadores angiogénicos unidos a la matriz, como bFGF, VEGF y TGF- β y activar quimioquinas angiogénicas como IL-1. Incluso hay estudios que demuestran que la actividad de algunas proteasas en la angiogénesis no tiene que ver con la proteólisis (Qi y cols., 2003).

Las proteasas también juegan un papel importante en la resolución de la angiogénesis, debido a que pueden liberar algunos inhibidores unidos a la matriz (trombospondina (TSP)-1 y factor plaquetario (PF)-4), generar fragmentos de colágeno (endostatina), plasminógeno (angiostatina) o de las propias proteasas con actividad antiangiogénica, así como inactivar citoquinas angiogénicas (factor derivado de las quimioquinas estromales-1) (Luttun y cols., 2000). Por otra parte, la actividad de las metaloproteinasas, y por tanto la angiogénesis, se contrarresta con los inhibidores titulares de metaloproteinasas (TIMP) (Gómez y cols., 1997).

La arrestina, canstatina, tumstatina y endostatina son inhibidores endógenos de la angiogénesis derivados de los colágenos XVIII y IV. Estos fragmentos de proteína se producen como consecuencia de la proteólisis de colágeno en el recambio normal de la membrana basal. Probablemente sea la unión de estos fragmentos a integrinas lo que medie su actividad antiangiogénica (Kalluri, 2003). La endostatina, probablemente la más estudiada de estas proteínas, es un inhibidor específico de la migración y proliferación endotelial y también induce apoptosis de las células endoteliales en proliferación (O'Reilly y cols., 1997).

En los últimos años se ha demostrado la actividad proangiogénica o antiangiogénica de otros componentes de la membrana basal. Entre ellos se incluyen el perlecan (proteoglicanos de heparán sulfato), laminina, proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC o BM-40 u osteonectina), colágeno XV y colágeno XVIII (Kalluri, 2003).

Algunos factores de crecimiento, como los FGF, están implicados en la alteración de la integridad mecánica de la matriz extracelular, y de esta manera regulan la angiogénesis (Ingber y Folkman, 1989).

Las integrinas son receptores celulares de membrana para moléculas de la matriz extracelular compuestas de dos subunidades, α y β , que se combinan formando complejos heterodiméricos. Las integrinas transmiten información bidireccionalmente entre el interior y el exterior de la célula endotelial, y ayudan así a la regulación de la angiogénesis en coordinación con el medio que rodea al endotelio (Hynes, 2002). Algunos estudios han demostrado que, en condiciones normales, los componentes de la membrana basal se unen a una serie de integrinas, pero cuando se altera la estructura de la membrana basal sus componentes se unen a otras integrinas diferentes (Gardner, 1999).

1.3.5. Leucocitos

Los leucocitos tienen gran importancia en la regulación de muchos procesos angiogénicos por su capacidad de producción de numerosos factores, como VEGF, PlGF, PDGF-BB, bFGF, Ang-2, EGF, TGF- β 1, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1, varias interleuquinas y proteasas. Pero los leucocitos también son productores de inhibidores angiogénicos, por lo que su función en el inicio o la finalización de la angiogénesis depende del balance espacial y temporal en que se encuentren (Carmeliet, 2003).

1.4. Angiogénesis específica de órganos

La angiogénesis específica de órganos viene determinada en primer lugar por la expresión y actividad de factores angiogénicos generales, como VEGF y Ang-1, que varían enormemente de unos tejidos a otros (Visconti y cols., 2002; Jain y Munn, 2000). En segundo lugar, hay factores angiogénicos específicos que determinan el comienzo del proceso angiogénico de una manera específica en cada órgano (LeCouter y cols., 2001).

1.5. Implicaciones patológicas de la angiogénesis

La pérdida del control orgánico sobre la angiogénesis constituye uno de los elementos característicos de algunas enfermedades, determinando que sea la propia patología la que regule, en su "beneficio", el proceso de angiogénesis. Esta desregulación puede ir en ambos sentidos; es decir, tanto en un aumento como en una disminución del proceso.

Se produce una angiogénesis insuficiente cuando un tejido no puede producir cantidades adecuadas de factores de crecimiento angiogénico. Esto supone un inadecuado crecimiento de los vasos sanguíneos en zonas que lo requieren, lo que impide que se restaure el flujo sanguíneo y, por consiguiente, dificulta o incluso llega a impedir que el tejido en cuestión recupere la normalidad, pudiendo llegar a morir (necrosis).

Por el contrario, se produce un exceso de angiogénesis cuando células o tejidos alterados producen cantidades anormales de factores de crecimiento angiogénico, sobrepasando la capacidad de regulación de los inhibidores naturales de la angiogénesis. En estas condiciones, los tejidos desarrollan nuevos vasos sanguíneos, lo que provoca la destrucción de los tejidos normales y, como es el caso del cáncer, los nuevos vasos permiten el suministro de sangre a los tumores, lo que resulta determinante para su desarrollo y facilita vías adicionales de diseminación de las células tumorales y con ello las metástasis en tejidos lejanos del foco tumoral primario. En este sentido, Folkman propuso el concepto de la terapia antiangiogénica como una alternativa y ayuda a las terapias tradicionales anticancerígenas (Folkman, 1971), que ha sido objeto de numerosas investigaciones en las tres últimas décadas.

1.5.1. Enfermedades caracterizadas o causadas por angiogénesis insuficiente o regresión de los vasos

□ **Que afectan al sistema nervioso:** Alzheimer (se produce vasoconstricción, degeneración microvascular y angiopatía cerebral debido a la toxicidad que el amiloide- β genera en las células endoteliales (de la

Torre, 2002)); esclerosis lateral amiotrófica y neuropatía diabética (enfermedades caracterizadas por la degeneración de las motoneuronas a causa de la insuficiente producción de VEGF (Oosthuysen y cols., 2001)); apoplejía (existe una correlación entre supervivencia y angiogénesis cerebral (Krupinski y cols., 1994)).

□ **Que afectan a los vasos sanguíneos:** aterosclerosis (desarrollo insuficiente de vasos colaterales (Van Belle y cols., 1997)); hipertensión (baja densidad de capilares (Boudier, 1999)); diabetes (caracterizada por el escaso crecimiento colateral y angiogénesis insuficiente en tejidos isquémicos (Waltenberger, 2001), sin embargo se produce un aumento de la neovascularización retinal); restenosis (por una falta de re-endotelización después del daño arterial en edades avanzadas (Gennaro cols., 2003)).

□ **Que afectan al sistema digestivo:** ulceraciones orales o gástricas (se produce un retraso en su cicatrización debido a la producción de inhibidores angiogénicos que generan algunos patógenos (Jenkinson y cols., 2002)); enfermedad de Crohn (caracterizada por isquemia en la mucosa).

□ **Que afectan a la piel:** pérdida capilar (los inhibidores angiogénicos retardan el crecimiento del cabello (Yano y cols., 2001)); piel púrpura, telangiectasia (reducción edad-dependiente del número de vasos, así como de su maduración (Chang y cols., 2002)).

□ **Que afectan al aparato reproductor:** pre-eclampsia (por disfunción de la célula endotelial debida a la ausencia de VEGF que produce el Flt-1 soluble (Maynard y cols., 2003)); menorragia (por la fragilidad de los capilares debida a la baja producción de Ang-1 (Hewett y cols., 2002)).

□ **Que afectan al pulmón:** distress respiratorio neonatal (maduración pulmonar insuficiente en prematuros debida a la escasa producción de HIF-2 α y VEGF (Compennolle y cols., 2002)); fibrosis pulmonar, enfisema (por apoptosis de las células endoteliales debida a la inhibición de VEGF (Kasahara y cols., 2000)).

□ **Que afectan al riñón:** nefropatías (se produce degeneración de los vasos en edades avanzadas debida a la producción de TSP-1 (Kang y cols., 2001)).

□ **Que afectan a los huesos:** osteoporosis (el declive de la angiogénesis mediada por VEGF hace que no haya una formación de huesos normal (Martínez y cols., 2002)), cicatrización lenta de las fracturas de huesos (causada por inhibidores angiogénicos (Yin y cols., 2002)).

1.5.2. Enfermedades caracterizadas o causadas por una angiogénesis anormal o excesiva

□ **Que afectan a muchos órganos:** cáncer (activación de oncogenes o pérdida de supresores tumorales); enfermedades infecciosas (los patógenos expresan genes angiogénicos (Meyer y cols., 1999), inducen programas angiogénicos (Harada y cols., 2000) o transforman las células endoteliales (Barrilari y Ensoli, 2002)); desórdenes autoinmunes (activación de leucocitos).

□ **Que afectan a los vasos sanguíneos:** malformaciones vasculares (mutación de Tie-2 (Vikkula y cols., 1996)); síndrome de DiGeorge (baja expresión de VEGF y neuropilina-1 (Stalmans y cols., 2003)); telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT) (mutaciones en endogлина o ALK-1 (van den Driesche y cols., 2003)); hemangioma cavernoso (Pérdida de la conexina 37 y la conexina 40 (Simon y McWhorter, 2002)); aterosclerosis; arteriopatía del trasplante.

□ **Que afectan al tejido adiposo:** obesidad (angiogénesis inducida por dietas grasas); pérdida de peso inducida por inhibidores de la angiogénesis (Rupnick y cols., 2002).

□ **Que afectan a la piel:** soriasis, verrugas, dermatitis alérgica, cicatrices queloides, granulomas piogénicos, ampollas, sarcoma de Kaposi en individuos con SIDA (Barillari y Ensoli, 2002).

□ **Que afectan a los ojos:** síndrome vítreo de hiperelasticidad persistente (pérdida de Ang-2 (Hackett y cols., 2002) o VEGF₁₆₅ (Stalmans y

cols., 2002)), retinopatía diabética, retinopatía de los prematuros, neovascularización coroidal (mutación de TIMP-3 (Qi y cols., 2003)).

□ **Que afectan al pulmón:** hipertensión pulmonar primaria (mutación del receptor de BMP (BMPR)-2 o de las células endoteliales somáticas (Humbert y Trembath, 2002; Voelkel y cols., 2002; Yeager y cols., 2002)), asma, pólipos nasales.

□ **Que afectan al intestino:** enfermedad inflamatoria intestinal y periodontal, ascitis, adhesiones peritoneales.

□ **Que afectan al aparato reproductor:** endometriosis, sangrado uterino, quistes ováricos, hiperestimulación ovárica (LeCouter y cols., 2001).

□ **Que afectan a los huesos y articulaciones:** artritis, sinovitis, osteomielitis, formación de osteofitos (Luttun y cols., 2002 b).

2. Arteriogénesis

Mientras los capilares distribuyen la sangre a las células individuales, las arterias distribuyen el flujo sanguíneo a los tejidos. Por eso, cuando una arteria se obstruye el espacio vascular que ella irriga se vuelve isquémico. Para que esto no suceda, existen vasos colaterales interconectados con los sistemas arteriales del organismo, de tal manera que tras la obstrucción de una arteria, otra arteria colateral se puede ampliar y salvar así la región isquémica (Helisch y Schaper, 2003). Este proceso, conocido como arteriogénesis (Figura 10), está involucrado junto con la angiogénesis en el remodelado vascular (Van Royen y cols., 2001 b).

Los modelos experimentales de enfermedad arterial periférica, como la isquemia en la pata trasera producida por la ligadura de la arteria femoral, se han utilizado extensamente para estudiar los procesos de remodelado vascular. Con estos modelos se ha demostrado que la arteriogénesis en la parte superior del muslo de animales con enfermedad vascular periférica experimental incrementa el flujo sanguíneo en el resto de

la pata (Hershey y cols., 2001; Ito y cols., 1997; Scholz y cols., 2000; Van Royen y cols., 2001 b).

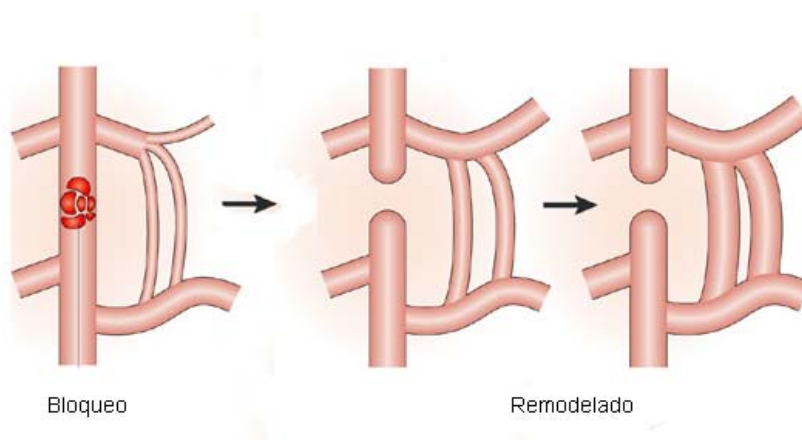


Figura 10. Proceso de arteriogénesis. Cuando una arteria se obstruye, los vasos preexistentes colaterales sufren una remodelación gradual, ensanchándose para poder hacer frente al flujo sanguíneo que conducía la arteria obstruida (modificado de Simons y Ware, 2003).

Los modelos experimentales de enfermedad arterial periférica, como la isquemia en la pata trasera producida por la ligadura de la arteria femoral, se han utilizado extensamente para estudiar los procesos de remodelado vascular. Con estos modelos se ha demostrado que la arteriogénesis en la parte superior del muslo de animales con enfermedad vascular periférica experimental incrementa el flujo sanguíneo en el resto de la pata (Hershey y cols., 2001; Ito y cols., 1997; Scholz y cols., 2000; Van Royen y cols., 2001 b).

2.1 Regulación de la arteriogénesis

La angiogénesis y la arteriogénesis tienen lugar en tipos diferentes de vasos sanguíneos y se regulan por estímulos distintos. El aumento del “shear stress” en los vasos colaterales (desencadenado después de la oclusión de la arteria mayor) parece ser el estímulo primario de arteriogénesis (VanRoyen y cols., 2001 a). Sin embargo, en los modelos animales de enfermedad vascular periférica, la isquemia tisular no parece que controle de manera importante la arteriogénesis, pues los vasos

colaterales que se están remodelando no están rodeados de tejido isquémico (Ito y cols., 1997; Scholz y cols., 2000; VanRoyen y cols., 2001 a).

Las diferencias de presión en las zonas de perfusión y el “shear stress” hacen que las células endoteliales se activen y recluten monocitos. Estas células producen factores de crecimiento y proteasas, los cuales hacen que las células del músculo liso vascular puedan migrar y dividirse (Heil y cols., 2002). En este sentido, las citoquinas que atraen monocitos o prolongan su vida (como MCP-1, TGF- β 1 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α) aumentan el crecimiento colateral, mientras que las citoquinas anti-inflamatorias (como IL-10) lo inhiben (Carmeliet, 2003). El PlGF también favorece el crecimiento colateral, no sólo porque atrae monocitos, sino también porque estimula el crecimiento de las células endoteliales y las células del músculo liso vascular (Luttun y cols., 2002 b). También se han descrito otros factores de crecimiento involucrados en el crecimiento colateral, como aFGF, bFGF y PDGF-BB (Carmeliet, 2003). Sin embargo, el VEGF tiene mucha menos eficiencia en el crecimiento colateral que en la angiogénesis de capilares (Helisch y Schaper, 2003).

3. Vasculogénesis

La vasculogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de células progenitoras de las células endoteliales. La vasculogénesis contribuye al crecimiento de los vasos no sólo en el embrión, como se creía hasta hace pocos años, sino también en tejidos isquémicos, malignos o inflamados del individuo adulto (Carmeliet, 2003).

En el embrión, las células endoteliales provienen de los angioblastos (Mikkola y Orkin, 2002) (Figura 11). En cambio, en el individuo adulto provienen de las células progenitoras endoteliales, de mesoangioblastos, de células progenitoras multipotenciales o de las llamadas “side population cells”, todas ellas producidas por la médula ósea (Luttun y cols., 2002 a; Reyes y cols., 2002).

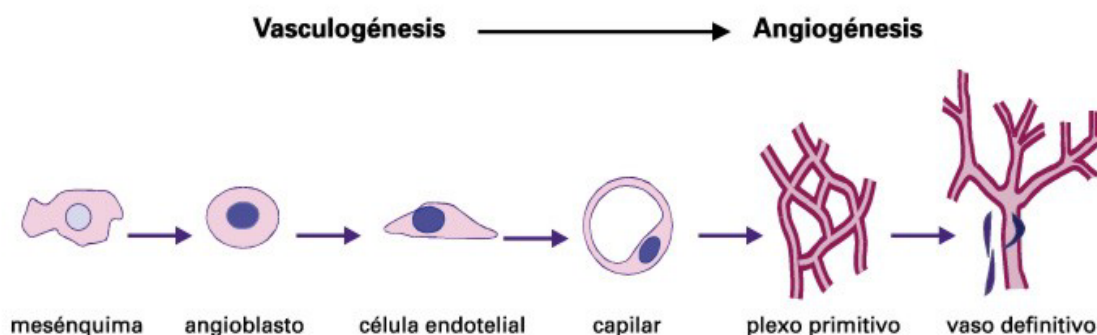


Figura 11. Esquema del desarrollo vascular embrionario. Se indican las células que se diferencian sucesivamente, y las estructuras que forman. Los procesos que culminan en la formación del plexo capilar primitivo son denominados vasculogénicos, y los angiogénicos son aquellos en los que se desarrollan los vasos definitivos.

3.1. Regulación de la vasculogénesis

Existen numerosas señales celulares que hacen diferenciarse a las células progenitoras de las células endoteliales, y por lo tanto contribuyen al crecimiento vascular; entre ellas se encuentran el VEGF, PlGF, Ang-1, proteínas inhibidoras de la diferenciación, citoquinas... (Gerber y cols., 2002; Hattori y cols., 2002; Lyden y cols., 2001; Luttun y cols., 2002 a).

El origen de las células endoteliales de las venas y las arterias no es el mismo. Estudios genéticos recientes han demostrado la existencia de señales que controlan el origen arterial o venoso de las células endoteliales. La vía de Notch, con sus ligandos y receptores, promueve células endoteliales arteriales y reprime las venosas. El gen Sonic Hedgehog, VEGF, y la vía de señalización de Gridlock intervienen en esta ruta (Lawson y cols., 2002; Zhong y cols., 2001).

4. Regresión de vasos

La regresión de vasos es un mecanismo fisiológico que tiene lugar cuando la vasculatura en un tejido está formada por un número excesivo de vasos. Sin embargo, la regresión anormal de los vasos sanguíneos

contribuye a la patogénesis de algunas enfermedades. La retirada de los estímulos angiogénicos es causa de la regresión de los vasos, especialmente cuando todavía son inmaduros (Dor y cols., 2002).

4.1. Regulación de la regresión de vasos

El flujo es generalmente el factor que determina si los nuevos vasos formados persisten o regresan. Bajo la influencia de varios factores (metaloproteinasas matriciales, PDGF-BB, bFGF, integrinas, NO) el flujo sanguíneo estimula la hiperplasia de las células endoteliales y del músculo liso vascular e induce la reorganización de las uniones endoteliales y la deposición de matriz extracelular. Por lo tanto, una perfusión adecuada contribuye a la maduración de los vasos, mientras que una perfusión insuficiente causa su regresión (Boudier, 1999).

Los pericitos también determinan la susceptibilidad de los vasos a la regresión. Una vez que los vasos se rodean de pericitos, se hacen resistentes a la regresión inducida por la falta de oxígeno. La liberación de PlGF o VEGF con PDGF-BB produce maduración de los vasos y causa su persistencia y estabilidad (Luttun y cols., 2002 b). Sin embargo, si se rompe la asociación endotelio-pericitos se desencadena la regresión de los vasos (Benjamin y cols., 1998).

Los inhibidores de la angiogénesis también contribuyen a la regresión de los vasos. La TSP-1 inhibe la angiogénesis a través de efectos directos sobre las células endoteliales y efectos indirectos activando o movilizándolo factores de crecimiento (Vailhe y Feige, 2003). Cuando los niveles de VEGF son bajos, la Ang-2 desencadena la regresión de los vasos (Holash y cols., 1999). Los interferones suprimen los efectos angiostáticos porque reducen la expresión de bFGF y VEGF. Los macrófagos contribuyen a la regresión de los vasos porque liberan TGF- β 1 (Schonfeld, 1996). Entre otros inhibidores también se encuentran algunas quimioquinas, receptores solubles, antagonistas de la coagulación, moléculas que se unen a los componentes de la matriz extracelular, proteinasas y proteínas plasmáticas (Carmeliet, 2003) (Figura 12).

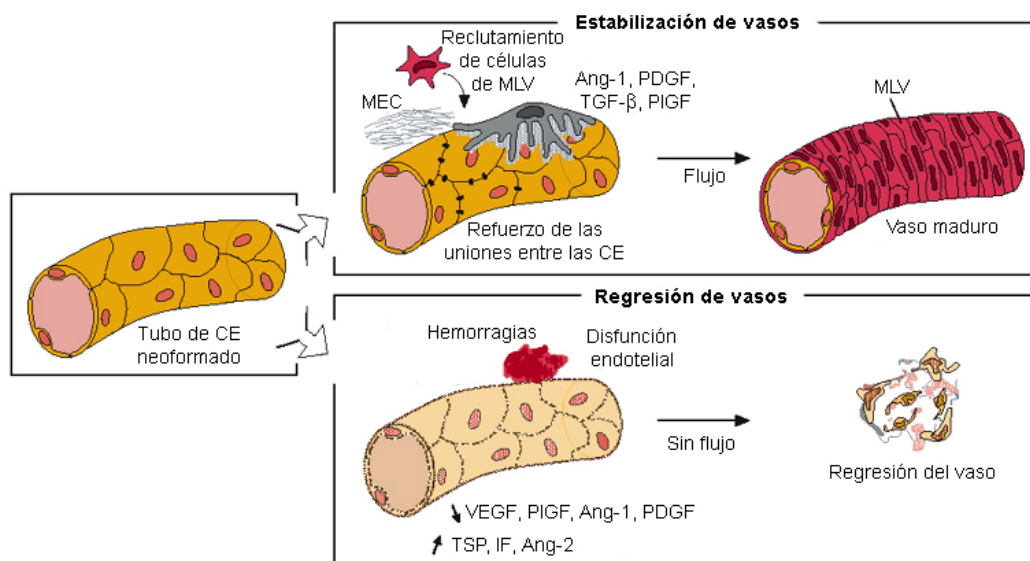


Figura 12. Mantenimiento/regresión de vasos. Los vasos neoformados requieren factores angiogénicos y arteriogénicos para su maduración y mantenimiento. El flujo es un factor crítico para el mantenimiento del vaso. Cuando los factores angiogénicos y arteriogénicos son insuficientes y en cambio predominan los factores inhibidores de la angiogénesis, los vasos neoformados permanecen desnudos y frágiles, por los que son muy sensibles a la ruptura produciendo hemorragias. Estas condiciones favorecen la reducción del flujo y la regresión del vaso (modificado de Carmeliet, 2003). CE: células endoteliales. MEC: matriz extracelular. MLV: músculo liso vascular.

5. Reparación de heridas

La formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los preexistentes (angiogénesis) es fundamental en los procesos de reparación (Folkman y Shing, 1992). Los nuevos vasos participan en la formación del tejido de granulación provisional y aportan oxígeno y nutrientes al tejido en reparación. Además, las células que participan en la inflamación, requieren la interacción y la trans migración a través de la membrana basal de las células endoteliales de los vasos para llegar al tejido dañado.

La reparación de todos los tejidos del organismo se lleva a cabo siguiendo los mismos procesos, y salvo pequeñas diferencias, con la participación de los mismos mediadores. Nosotros elegimos para nuestro estudio la reparación de heridas cutáneas, pero casi la totalidad de los procesos descritos serían aplicables a cualquier tejido del organismo.

5.1. Fisiología de la piel

La piel es el órgano vital más extenso, más delgado y uno de los de mayor relevancia del organismo. Se encuentra en forma de una lámina desplegada, que cubre la totalidad de la superficie corporal y se continúa con los orificios naturales a través de las semimucosas y mucosas. Posee estructuras especialmente adaptadas que le permiten cumplir con sus múltiples funciones (Tabla 1), que son esenciales para mantener la homeostasis y, en consecuencia, para la propia supervivencia. Comprenden procesos tan diversos como la protección de agentes externos, la regulación de la temperatura, la síntesis de importantes sustancias químicas y hormonas, y la excreción de agua y sales. Además, la piel contiene receptores sensitivos que hacen que sea el principal órgano sensorial. La piel está compuesta por dos láminas principales: la más externa y fina, llamada epidermis, y otra, más interna y gruesa, denominada dermis. Por debajo de la dermis se encuentra una capa subcutánea, laxa, rica en grasa, que se denomina hipodermis (Figura 13).

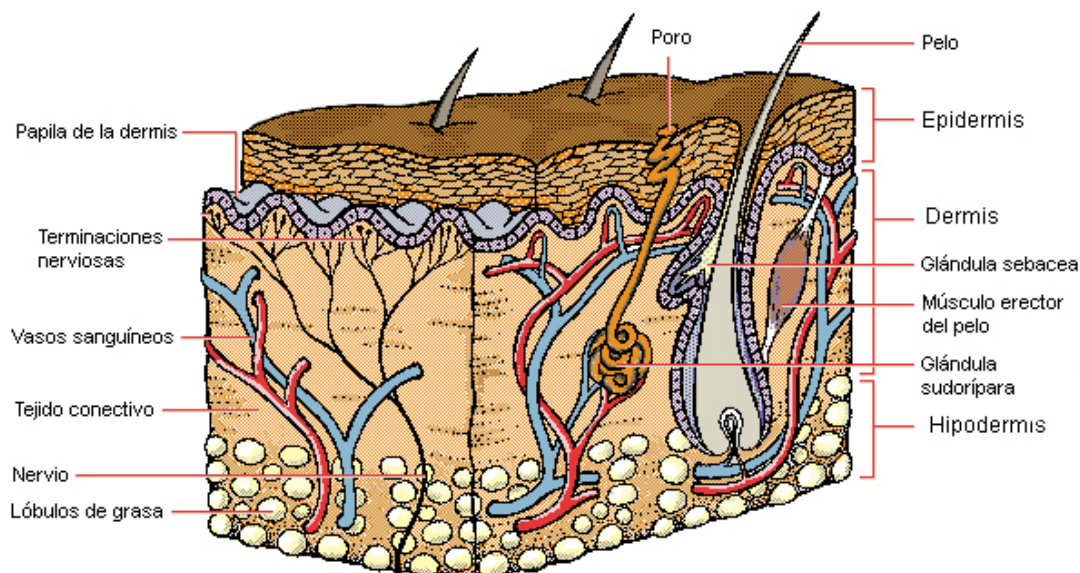


Figura 13. Estructura de la piel.

Tabla 1. Funciones de la piel y elementos constitutivos participantes

Función	Elementos participantes
Barrera. Protección contra: - partículas físicas - agentes químicos - radiaciones ultravioletas - antígenos (inmunoprotección) - agentes biológicos (bacterias, etc.)	capa córnea - pelos melanocitos - capa córnea - pelos células de Langerhans - queratinocitos capa córnea - células de Langerhans - pH ácido - descamación epidérmica - secreción glandular sebácea - desecación
Preservación del medio interno: - prevención de pérdida de agua, electrolitos y macromoléculas - almacenamiento hidroelectrolítico	capa córnea - glándulas sudoríparas ecrinas dermis
Absorción de agresiones físicas externas: - presión - golpes - elasticidad y movimientos cutáneos	dermis - hipodermis dermis - hipodermis
Termorregulación	vasos sanguíneos - glándula sudorípara ecrina (evaporación de sudor) - hipodermis (aislante)
Síntesis de vitamina D	queratinocitos
Captación de sensaciones	inervación cutánea
Expresión de emociones	vasodilatación (vergüenza).- vasoconstricción (temor)-sudor (ansiedad)
Lubricación de la superficie cutánea	glándula sebácea - glándula sudorípara ecrina (emulsión)
Preensión	dermatoglifos - glándula sudorípara ecrina - uñas
Roce en pliegues	pelos
Reserva nutricional y energética	hipodermis
Olor	glándula sudorípara apocrina
Cicatrización	dermis - epidermis - folículo piloso

5.1.1. Epidermis

La epidermis está constituida, de la profundidad a la superficie, por las capas basal, espinosa, granulosa y córnea, que no son más que distintas formas de una misma célula (queratinocito), que en su proceso de maduración ascendente (evolucionando hacia una muerte programada), se va diferenciando y adquiere morfologías y funciones particulares hasta llegar a formar la capa córnea, constituida por corneocitos, que son células muertas con gran contenido en queratina. Los queratinocitos poseen distintas estructuras de unión entre ellos, siendo las más importantes los desmosomas. El tiempo de tránsito desde la célula basal al corneocito y su desprendimiento final (descamación), es de unos treinta días. La epidermis en su totalidad desempeña una función fundamental de protección y

defensa; tanto por la continua formación de queratina, como por los mecanismos inmunes que allí se generan (producción de interleuquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, etc.). También interviene en la síntesis de vitamina D.

Entre las células de la capa basal se intercalan los melanocitos (un melanocito cada diez células basales), células dendríticas que producen melanina, de acción protectora contra las radiaciones ultravioletas. La melanina, contenida en pequeñas organelas citoplasmáticas denominadas melanosomas, es transferida a los queratinocitos, ubicándose sobre el núcleo para preservar al ADN de la luz solar. En la zona suprabasal de la epidermis existe una red integrada por las células de Langerhans, también dendríticas, que actúan como células presentadoras de antígenos. Otro tipo celular ubicado sobre la membrana basal son las células de Merkel o células neuroendocrinas de la piel.

La epidermis se comunica con la dermis a través de la membrana basal. Esta lámina de estructura fibrilar compleja, es ondulada para permitir una mayor superficie de contacto entre ambas capas (Eady y cols, 1998).

5.1.2. Dermis

La dermis está constituida por tejido conjuntivo laxo compuesto por fibras de colágeno (95% del material fibrilar) y elastina (menos del 2% del material fibrilar), sustancia fundamental amorfa y células. Los fibroblastos, las células más abundantes, se observan como células fusiformes de núcleo claro y dan origen a las fibras y a la sustancia fundamental. En la dermis también se encuentran otras células, como macrófagos y mastocitos intermediarios de las reacciones alérgicas e inflamatorias. La dermis es atravesada por vasos sanguíneos, vasos linfáticos y receptores sensitivos. Contiene los anexos cutáneos y desempeña una función protectora, pues representa la segunda línea de defensa contra los traumatismos. Provee las vías y el sostén necesario para el sistema vascular cutáneo y constituye un enorme depósito potencial de agua, electrolitos y sangre. Está formado por dos capas funcional y metabólicamente distintas: la papilar, o dermis

superior, es una zona de tejido conectivo laxo cuyas fibras colágenas y elásticas se disponen en forma perpendicular al epitelio, determinando la formación de papilas que contactan con la parte basal de la epidermis. En este nivel se encuentran receptores de presión superficial o tacto (corpúsculos de Meissner). La capa reticular, o dermis profunda, contiene la mayoría de los nexos de la piel. Está constituida por tejido conectivo con fibras elásticas que se disponen en todas las direcciones y se ordenan en forma compacta, dando resistencia y elasticidad a la piel. Posee fibras musculares lisas que corresponden a los músculos erectores de los pelos (Pope, 1998).

5.1.3. Hipodermis

La dermis se continúa en profundidad con la hipodermis. La hipodermis o grasa subcutánea esta integrada por lobulaciones de tejido adiposo (acúmulo de adipocitos), separados por tabiques conjuntivos, por donde transcurren los vasos y nervios. Tiene función de reserva nutricional y energética, de protección contra presión y traumatismos y de aislamiento del frío.

5.1.4. Anexos de la piel

Las glándulas sudoríparas ecrinas poseen un glomérulo secretor y un conducto excretor que desembocan directamente en la epidermis. Participan en el metabolismo hidroclorado, en la termorregulación por la evaporación del sudor y en la humectación de la superficie cutánea.

Las glándulas sudoríparas apocrinas poseen un gran lóbulo secretor y un conducto excretor dérmico que desemboca en el folículo pilosebáceo.

Las glándulas sebáceas desembocan en el folículo piloso y su secreción posee capacidad bacteriostática, fungistática y de emulsión lubricante en superficie (junto con la secreción acuosa de las glándulas sudoríparas).

Los folículos pilosos presentan en profundidad un ensanchamiento denominado bulbo, donde se encuentra la matriz (de importante actividad

mitótica) que rodea a la papila (estructura conectivo-vascular-nerviosa). En superficie el pelo emerge a través de un orificio. Tienen función protectora de las radiaciones ultravioletas (cuero cabelludo), de la luz y gotas de sudor (cejas y pestañas), de filtro (nariz, oreja), participan reduciendo la fricción entre pliegues y contribuyen en la percepción de estímulos táctiles. Las uñas, al igual que los pelos, están constituidas por queratina dura, pero a diferencia de ellos, crecen de manera continua e indefinida formando una lámina de queratina de crecimiento horizontal. Protegen a la falange terminal de los dedos y colaboran en la prensión.

5.1.5. Irrigación de la piel

La circulación arterial cutánea tiene aspecto arboriforme, con la copa hacia la superficie. Los vasos arteriales provienen de las arterias musculares que ascienden a través de la hipodermis para formar un primer plexo profundo subdérmico (en la unión dermohipodérmica) y luego un segundo plexo superficial a nivel subpapilar (ambos unidos por vasos comunicantes perpendiculares a la superficie cutánea), donde forman una red densa de capilares con proyección hacia las papilas dérmicas, constituyendo una importante microcirculación en ese área, encargada de nutrir a la epidermis que es avascular. Esta circulación arterial también nutre a todos los elementos constitutivos de la piel e interviene en la termorregulación (vasodilatación para perder calor y vasoconstricción para conservarlo), colabora con la regulación de la presión arterial y posibilita la respuesta inflamatoria (mecanismo de defensa). En condiciones basales, están activos entre el 10 y el 20% de los vasos dérmicos.

La circulación venosa que drena la sangre cutánea, se reúne en tres plexos: uno superficial subpapilar, uno intermedio localizado en las partes medias de la dermis reticular y uno profundo subdérmico.

Los vasos linfáticos nacen en la parte alta de la dermis en forma de fondo de saco y siguen el trayecto de los plexos vasculares.

5.1.6. Inervación

La piel es muy rica en terminaciones nerviosas sensitivas, que conducen los impulsos por vías aferentes hacia el sistema nervioso central. Las terminaciones de tipo libre de epidermis y dermis son capaces de reconocer frío, calor, dolor, prurito, y las que rodean a las estructuras pilosas tienen funciones mecanoreceptoras. Las terminaciones tipo receptores encapsulados (Meissner, Paccini, Ruffini y Krause) intervienen en la sensación de tacto, presión y mecanorecepción. Toda esta importante inervación, hace de la piel un órgano sensorial de primer nivel, con funciones tanto protectoras, por captar estímulos potencialmente dañinos, como vinculadas a la relación con el medio exterior.

El sistema motor está integrado por fibras eferentes simpáticas. Las de tipo adrenérgicas (y en menor grado las colinérgicas) intervienen en la contracción del mioepitelio de las glándulas sudoríparas apocrinas, del músculo erector del pelo y en la vasoconstricción arteriolar; las de tipo colinérgicas inervan a las glándulas sudoríparas ecrinas.

5.2. Secuencia de eventos en la reparación de heridas cutáneas

Considerando que toda herida es una puerta abierta por la que pueden penetrar cuerpos extraños y gérmenes y salir líquidos orgánicos, su cierre es una necesidad urgente para el organismo. Tras una agresión externa, la reparación de los tejidos se lleva a cabo por dos procesos diferentes e interrelacionados, cuyo balance determinará la respuesta final del organismo. La cicatrización es el proceso por el cual se genera un nuevo tejido sin las funciones del tejido original mientras que la regeneración es el proceso que implica la creación de tejido nuevo idéntico al primario, y que permite la conservación de la función.

La curación de las heridas cutáneas comprende una larga secuencia de fenómenos íntimamente relacionados entre sí, inducidos por mediadores bioquímicos, enzimáticos y hormonales (Figura 14).

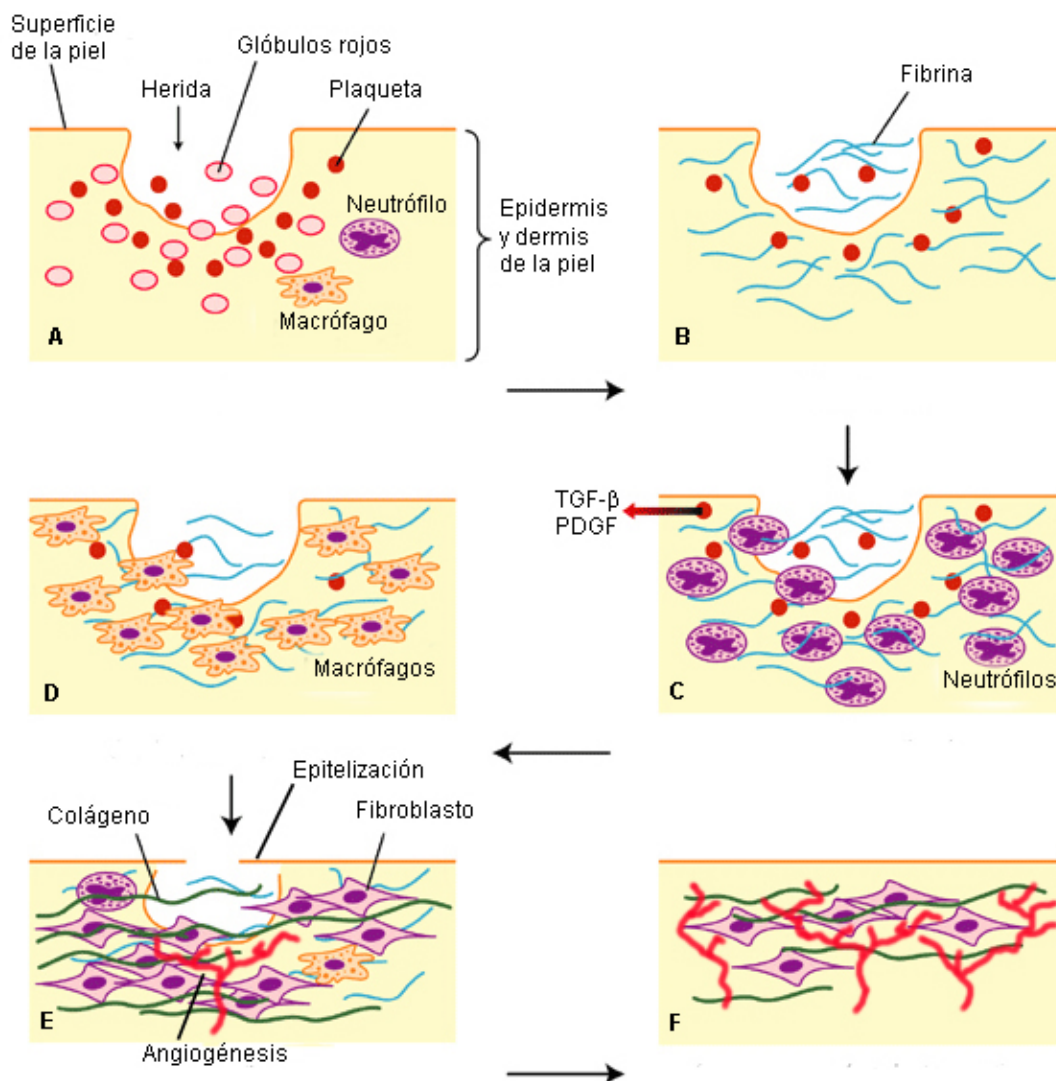


Figura 14. Fases de la cicatrización de heridas cutáneas. A. Daño. B. Coagulación. C. Inflamación temprana (24 horas). D. Inflamación tardía (48 horas). E. Proliferación (72 horas) F. Remodelado (semanas, incluso meses) (modificado de Beanes y cols., 2003).

5.2.1. Fase temprana: hemostasia e inflamación

Tras producirse la herida, en el foco de la lesión se encuentran el tejido total o parcialmente desvitalizados, sangre extravasada, cuerpos extraños y gérmenes (Figura 14A). La respuesta local frente a estas lesiones es el desarrollo progresivo de un estado de inflamación aguda que va a cumplir dos objetivos: limpieza del foco traumático y acumulación del material necesario para la reparación. El fenómeno inflamatorio agudo consta de dos fases integradas: en primer lugar, se produce una

vasoconstricción transitoria producida en gran parte por la liberación de tromboxano A₂ (TXA₂) de las plaquetas. La vasoconstricción, junto con la formación de coágulos ricos en fibrina (como consecuencia de la activación de la cascada de la coagulación) y la agregación plaquetaria ayudan a mantener la hemostasia (Figura 14B).

Inmediatamente después de esta vasoconstricción se produce una vasodilatación activa y un aumento de la permeabilidad vascular mediada por histamina, quininas, y prostaglandinas fundamentalmente. La filtración de plasma provoca un edema intersticial rico en proteínas, anticuerpos, complemento, agua y electrolitos, produciéndose una atmósfera biológica adecuada para el desarrollo de los próximos fenómenos de reparación. Además de esta respuesta vascular, la respuesta inflamatoria también produce movimientos celulares hacia la zona lesionada, que coinciden con la vasodilatación. Mediadores enzimáticos locales (derivados del complemento, histamina, prostaglandina E₂ (PGE₂), leucotrienos, TNF- α , productos de la degradación de la fibrina, PF-4, PDGF, TGF- β ...) producen fenómenos de marginación, adherencia y diapédesis de los neutrófilos, que son las primeras células que aparecen en el foco traumático (Martín, 1997) (Figura 14C). Los neutrófilos comienzan la lisis y fagocitosis de los gérmenes contaminantes y de los cuerpos extraños. Además, los neutrófilos producen citoquinas proinflamatorias que sirven de señales tempranas para activar a los fibroblastos y queratinocitos locales (Hubner y cols., 1996). La reacción de limpieza leucocitaria es completada y posteriormente sustituida por los macrófagos (Figura 14D). Los monocitos son atraídos hacia el tejido dañado mediante diferentes factores (fibronectina, colágeno, elastina, trombina y TGF- β). Una vez en el espacio extravascular se adhieren a la matriz extracelular y se activan gracias a IL-2, al interferon (IFN)- γ derivado de los linfocitos T, a los estímulos procedentes de los microorganismos implicados y a PDGF. Una vez activados, los macrófagos fagocitan residuos como bacterias y tejido necrótico al tiempo que secretan diferentes enzimas, como elastasas y colagenasas, para desintegrar el tejido lesionado (Brown, 1995). Los macrófagos preparan el terreno para el proceso reparador, ya que constituyen una de las principales fuentes de citoquinas que están implicadas en la cicatrización, favoreciendo la proliferación de fibroblastos y

la síntesis de colágeno. Entre estas citoquinas destacan TNF- α , PDGF, IL-1, el factor de crecimiento tipo insulina (IGF)-1, TGF- α y β y FGF (Singer y Clark, 1999; Martín, 1997).

5.2.2. Fase intermedia o proliferativa: fibroplasia, angiogénesis y epitelización

Mientras va cediendo el proceso inflamatorio los movimientos celulares en el foco traumático continúan con la aparición de los fibroblastos (Figura 14E), células básicas en la reparación cuya función es sintetizar los dos componentes básicos del tejido conectivo: el colágeno y los mucopolisacáridos de la sustancia fundamental. Son células que se encuentran en el tejido sano perilesional, y que atraídas por citoquinas de la fase temprana (PDGF, TGF- β , EGF, péptidos de colágeno y fibronectina), migran hacia la herida. Ellos mismos, a su vez, van a ser fuente de otros factores que recluten más fibroblastos y otras células (Singer y Clark, 1999; Martín, 1997).

Los fibroblastos producen fibroplasia (proceso de síntesis de las fibras que componen la matriz extracelular) de una manera desorganizada, y que sustituirá a la red inicial de fibrina. La síntesis de colágeno (proporcionalmente el mayor componente de la matriz) aumenta de manera progresiva hasta la cuarta semana, momento en el que disminuye debido a su destrucción mediante colagenasas. Distintos factores afectan a la síntesis de colágeno como son la edad, la tensión, la presión arterial y el estrés. También algunas citoquinas, como TGF- β , PDGF, FGF y EGF influyen en la fibroplasia. Además de colágeno, los fibroblastos también sintetizan otros componentes de la matriz extracelular, como son los proteoglicanos (condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparan sulfato, queratan sulfato y otros, pero de ellos el más común es el ácido hialurónico) y fibronectina. La elastina no se sintetiza como respuesta a la lesión y marca la diferencia entre la piel normal y la cicatriz, puesto que ésta última carece de elasticidad debido a la ausencia de esta proteína (Singer y Clark, 1999; Martín, 1997).

De un modo paralelo, se desarrolla un proceso de contracción, complementario a la reparación, en virtud del cual los bordes de la herida se acercan concéntricamente, disminuyendo el área de granulación. Este proceso reduce el tiempo de cicatrización y las necesidades reparativas. La tasa de contracción es dependiente de la forma de la herida y de la laxitud del tejido y el mecanismo por el cual se produce es discutido, aunque de lo que no hay duda es de que el miofibroblasto ocupa el papel protagonista. Los miofibroblastos se concentran en los márgenes de la herida, y actúan a modo de esfínter, en un proceso que no depende de la síntesis de colágeno. Entre las citoquinas que influyen en este proceso encontramos a TGF- β , PDGF, FGF e IFN- γ .

Paralelamente al aumento de fibroblastos, se produce también proliferación de las células endoteliales (Figura 14E). El daño capilar genera un estado de hipoxia que produce la respuesta angiogénica (Knighton y cols., 1981). Se ha demostrado un aumento en la expresión de VEGF y Ang-2 en el inicio de la angiogénesis en heridas cutáneas, que se mantiene hasta que la red vascular en la herida está establecida. Además se observa un primer descenso en la expresión de Ang-1 después de la formación de la herida, y un segundo descenso después de la maduración de los vasos. Las principales fuentes de VEGF en este proceso son los queratinocitos, monocitos y fibroblastos, mientras que la Ang-1 es producida fundamentalmente por los pericitos (Bloch y cols., 2000). Estos datos coinciden con la hipótesis de que VEGF y Ang-2 inducen la angiogénesis, mientras que Ang-1 está implicada en la estabilización de los vasos. La neoangiogénesis se produce a partir de las células endoteliales de los capilares abiertos, que por proliferación constituyen yemas vasculares, que vienen a aportar el oxígeno y los metabolitos necesarios. Se forman en esta fase numerosos vasos inmaduros; después, muchos degeneran y sólo algunos permanecen y se estabilizan (Zawicki y cols., 1981).

La angiogénesis es un proceso estrechamente relacionado con la hemostasia. En la cicatrización de heridas, la formación de coágulos ricos en fibrina y la agregación plaquetaria preceden a la formación de nuevos vasos. Las plaquetas, cuando se activan, liberan algunos factores angiogénicos, como VEGF, PDGF, TGF- β , IL-6 y trombina (Carmeliet, 2001;

Coussens y Werb, 2002), y estimulan el crecimiento y la estabilidad de los nuevos vasos que se desarrollan en la herida por su capacidad de fortalecer las uniones entre las células endoteliales y de reclutar células murales (English y cols., 2002). Además, las plaquetas contienen factores antiangiogénicos, como TSP-1 y PF-4, que juegan un papel importante en la resolución de la angiogénesis, una vez que la herida se ha cerrado.

En la fase intermedia también se produce la re-epitelización de la herida (Figura 14E), una de las fases fundamentales puesto que constituye la regeneración de la barrera de protección. La epitelización se consigue con la proliferación y migración de los queratinocitos desde los bordes de la herida hacia el centro, hasta formar un epitelio estratificado. Estos procesos están controlados mediante citoquinas del tipo EGF, TGF- α , IGF, FGF, KGF, TGF- β (sólo actúa sobre la migración). Los queratinocitos a su vez están capacitados para la síntesis de metaloproteinasas, que facilitan la migración y cuya secreción cesa cuando se produce la inhibición por contacto. Finalmente, es necesario tener en cuenta que la epidermis neoformada no es igual a la intacta, puesto que las crestas epidérmicas no son visibles. Además, el epitelio es más grueso en los márgenes de la herida y en la zona central del área reepitelizada (Singer y Clark, 1999; Martín, 1997).

5.2.3. Fase tardía: remodelado

Tras unos veinte días de cicatrización, la acumulación de colágeno se estabiliza. Su síntesis se regula a través del propio colágeno de la matriz, IFN- γ , TNF- α y TGF- β . En estos momentos la fuerza tensil que es capaz de soportar la cicatriz es aproximadamente de un 15% respecto a la piel normal. A partir de este momento se produce el remodelado de la matriz, es decir, la agregación y reorientación de las fibras de colágeno (Figura 14F). Este proceso, que puede durar varios meses, es el responsable del aumento en la fuerza tensil, hasta alcanzar el 80%, siendo éste el máximo esperable. El colágeno de nueva síntesis presenta algunas diferencias (organización, tamaño de las fibras, densidad, solubilidad...) con respecto al colágeno de la piel normal. Para conseguir el remodelado de la cicatriz entran en juego numerosas enzimas del grupo de las metaloproteinasas matriciales con

actividad colagenolítica, así como otras enzimas como la hialuronidasa. Estas enzimas están influenciadas por diferentes citoquinas como TGF- β , PDGF, IL-1 y EGF. Con este proceso se obtienen resultados visibles como el cambio de textura, grosor y color de la cicatriz (Singer y Clark, 1999; Martín, 1997).

5.3. Regulación de la cicatrización de heridas cutáneas

Los procesos de reparación están regulados por una serie de citoquinas (Tabla 2), algunas de las cuales tienen funciones similares, de forma que no está claro qué factores son críticos en cada proceso implicado en la cicatrización y responsables de su activación.

Tabla 2. Citoquinas implicadas en la cicatrización de heridas cutáneas

Factor	Origen	Función
PDGF	Plaquetas, macrófagos, endotelio, músculo liso vascular	Proliferación fibroblástica, quimiotaxis, activación de neutrófilos y macrófagos, angiogénesis
TGF- β	Plaquetas, neutrófilos, linfocitos, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos	Proliferación fibroblástica, quimiotaxis, angiogénesis indirecta.
TGF- α	Macrófagos activados, plaquetas, queratinocitos	Proliferación fibroblástica y epitelial
IGF	Plaquetas, plasma	Proliferación epitelial y fibroblástica, formación de tejido de granulación.
IL-1	Macrófagos, linfocitos	Proliferación fibroblástica, liberación de colagenasas, quimiotaxis
TNF	Macrófagos, mastocitos, linfocitos T	Proliferación fibroblástica
FGF	Macrófagos, glía	Proliferación epitelial y fibroblástica, depósito de matriz, contracción y angiogénesis
IFN- γ	Linfocitos, fibroblastos	Inhibición de la síntesis de colágeno y proliferación de fibroblastos

6. Endogлина

6.1. Estructura y características moleculares

La endogлина (CD105) es una glicoproteína homodimérica de membrana de 180 kDa que fue descubierta a mediados de los años 80 con el anticuerpo monoclonal 44G4 contra células linfoblásticas humanas (Quackenbush y Letarte, 1985; Quackenbush y cols., 1986). La endogлина se identificó originariamente en el endotelio vascular humano donde se encuentra en altos niveles (Gougos y Letarte, 1988 a). Se expresa de forma constitutiva en células endoteliales de capilares, venas y arterias (Li, D. y cols., 2001; Cheifetz y cols., 1992) y en células contráctiles como las del músculo liso vascular (Adam y cols., 1998) y células mesangiales (Rodríguez-Barbero y cols., 2001). También se ha identificado en otros tipos celulares como macrófagos activados (Lastres y cols., 1992), trofoblastos (Kruse y cols., 1999), fibroblastos (St-Jacques y cols., 1994) y otros tipos celulares aunque en menor grado.

En su estructura, similar en un 71% a la del betaglicano (Cheifetz y cols., 1992), posee oligosacáridos unidos a las cadenas peptídicas a través de enlaces N-asparagina y O-serina/treonina que constituyen aproximadamente el 20% del peso total de endogлина (Gougos y Letarte, 1988 b). La glicoproteína tiene un dominio citoplasmático de 47 aminoácidos, un dominio transmembrana único de 25 residuos y un dominio extracelular de unos 561 aminoácidos (Cheifetz y cols., 1992). La isoforma descrita corresponde a la endogлина larga (L-endogлина) aunque existe otra isoforma con el dominio citoplasmático más corto, de 14 aminoácidos, denominada endogлина corta (S-endogлина) (Gougos y Letarte, 1990; Bellón y cols., 1993). Mediante técnicas de inmunoblot en células endoteliales sólo se ha conseguido detectar la L-endogлина, lo que sugiere que es ésta la forma predominante (Li y cols., 2000).

Se ha descrito que el dominio extracelular de endogлина interacciona con TGF- β 1 y con otros componentes de la superfamilia de TGF- β como TGF- β 3, activina-A, BMP-7, y BMP-2 (Barbara y cols., 1999; Cheifetz y cols., 1992). Esta unión requiere la expresión de los receptores señalizantes

(Barbara y cols., 1999; Letamendía y cols., 1998 b), que forman complejos heteroméricos con endoglina (Yamashita y cols., 1994; Zhang y cols., 1996), lo que indica que esta proteína podría estar involucrada en la transducción de la señal de TGF- β .

El dominio citoplasmático de ambas isoformas está constitutivamente fosforilado en residuos serina-treonina, aunque el nivel de fosforilación de L-endoglina es bastante mayor que el de S-endoglina (Lastres y cols., 1994). Recientemente se ha demostrado que esta fosforilación constitutiva de endoglina es debida al T β R-II, constitutivamente activo (Guerrero-Esteo y cols., 2002). La unión de TGF- β a endoglina produce una regulación a la baja de la fosforilación, lo que sugiere un posible papel en la señalización celular o/y una asociación con otras proteínas del citoplasma (Lastres y cols., 1994).

En el dominio extracelular de la endoglina humana se encuentra la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) (Cheifetz y cols., 1992). El péptido RGD es una estructura reconocida por integrinas que se ha encontrado en proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, vitronectina, factor von Willebrand (vWF), colágeno I y fibrinógeno (Lawler y cols., 1988; Ruoslahti y Pierschbacher, 1987). El hallazgo del péptido RGD en la endoglina sugirió que ésta podía participar en procesos de adhesión celular a través de integrinas. La adhesión celular ha sido implicada en procesos como la hemostasis, trombosis e inflamación, fenómenos en los cuales el endotelio juega un papel muy importante (Lawler y cols., 1988; Ruoslahti y Pierschbacher, 1987). Sin embargo no se han encontrado las posibles integrinas que puedan interaccionar con la secuencia RGD de endoglina (Gougos y Letarte, 1990; Lastres y cols., 1992).

La endoglina de ratón es similar en un 72% a la endoglina humana, pero carece de la secuencia RGD (St-Jacques y cols., 1994). Las regiones mejor conservadas de endoglina son los dominios citoplasmático y transmembrana, con un 95% de identidad entre las formas humana y de ratón, lo que sugiere que el dominio citoplasmático puede interaccionar con otras proteínas intracelulares involucradas probablemente en la transducción de la señal de TGF- β (St-Jacques y cols., 1994).

6.2. Función

La endoglina forma parte del complejo de receptores de TGF- β y existen trabajos *in vitro*, que demuestran que reprime la señal de este factor de crecimiento en varios tipos celulares (Li y cols., 2000; Lastres y cols., 1996; Letamendía y cols., 1998 b; Díez-Marques y cols., 2002; Obreo y cols., 2004).

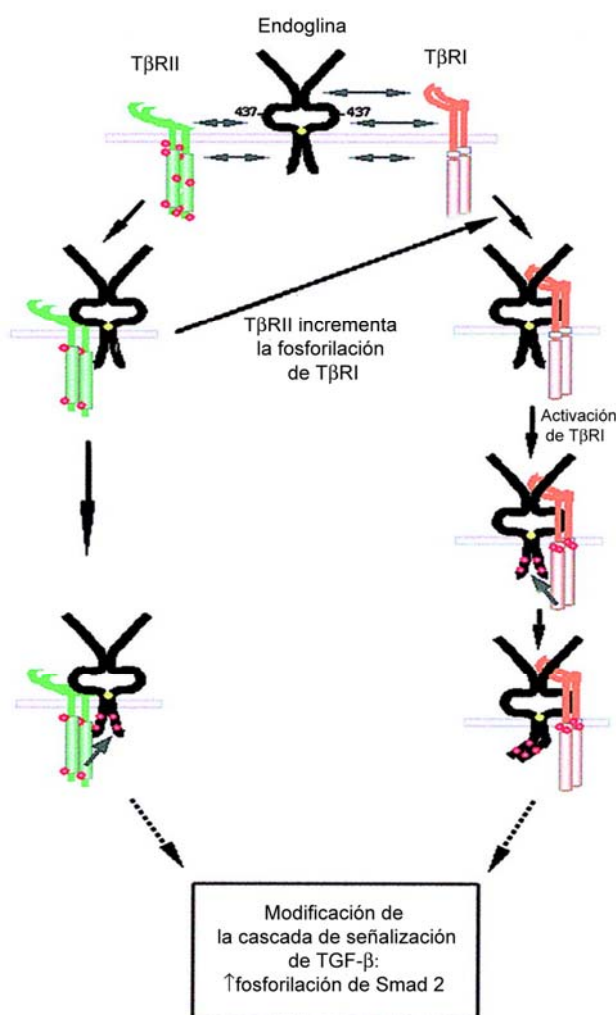
Pero la endoglina también puede encontrarse independientemente en la membrana celular. De hecho, solamente un pequeño porcentaje de endoglina expresada en la superficie celular se halla unida a TGF- β (Cheifetz y cols., 1992). En algunos trabajos se ha sugerido que la endoglina puede tener funciones independientes a la modulación de la señal de TGF- β . Por ejemplo, la sobreexpresión de endoglina afecta a la morfología y a la adhesión celular en la ausencia de TGF- β (Guerrero-Esteo y cols., 1999). Además, en células endoteliales la endoglina regula la organización del citoesqueleto (Conley y cols., 2004; Sanz-Rodríguez y cols., 2004), protege frente a la apoptosis producida por la hipoxia (Li y cols., 2003) y estimula la fosforilación de JNK-1 (Guo y cols., 2004).

6.3. Mecanismo de acción

Sobre el mecanismo de acción de endoglina se conoce todavía muy poco. Como hemos visto, se une a ligandos (TGF- β u otros factores de crecimiento), cuyos receptores son serina-treonina quinazas. La unión de endoglina a su ligando requiere la presencia de al menos el receptor II, y en el caso de BMP-7 también del receptor I (Barbara y cols., 1999). Sin embargo, la unión de los receptores con endoglina no altera su afinidad con el ligando. Una posibilidad es que la endoglina actúe presentando el ligando a los receptores. Como la endoglina reprime la señal de TGF- β , es posible que con esta presentación se consiga un bloqueo de los receptores señalizantes (Duff y cols., 2003). Guerrero-Esteo y cols. (2002) han propuesto un modelo de interacción de endoglina con el complejo de receptores de TGF- β : la L-endoglina puede unirse a T β R-I y T β R-II en la ausencia de TGF- β , pero la interacción con cada receptor es diferente

(Figura 15). El T β R-I sólo interacciona con endogлина cuando su dominio quinasa está inactivo, mientras que T β R-II interacciona con endogлина bajo sus dos formas, activa e inactiva. La expresión de endogлина inhibe los niveles de fosforilación de T β R-II, y aumenta los de T β R-I, lo que produce un incremento en la fosforilación de Smad 2, pero no de Smad 3. Como Smad 2 puede interaccionar con múltiples factores de transcripción, coactivadores y supresores, su fosforilación permite integrar múltiples señales que modulan la transcripción de muchos genes. De esta manera, la endogлина modula las funciones de TGF- β interaccionando con T β R-I y T β R-II y modificando la fosforilación de las Smads.

Figura 15.- Interacción de endogлина con los receptores quinasa T β R-I y T β R-II. La endogлина se asocia con T β R-II a través de dos interacciones, una en el dominio citoplasmático y otra en el extracelular. Con esta asociación, el T β R-II quinasa fosforila a endogлина y además aumenta el nivel de fosforilación de T β R-I, que a su vez fosforila a Smad 2. La endogлина también se asocia con T β R-I a través de tres interacciones, una en el dominio citoplasmático y dos en el extracelular. Con esta asociación, el T β R-I quinasa fosforila a endogлина y el dominio citoplasmático de ésta se libera de su unión al receptor. Estas interacciones modulan la señalización de TGF- β modificando el nivel de fosforilación de las Smads (modificado de Guerrero-Esteo y cols., 2002).



6.4. Regulación de la expresión

El promotor de endoglina (2.6 kb) no contiene cajas de iniciación de la transcripción, como TATA o CAAT. Sin embargo, tiene dos regiones ricas en GC reconocidas por Sp1, ets, GATA, AP-2, NF- κ B, Mad, así como por elementos de respuesta a TGF- β (Rius y cols., 1998). La endoglina tiene una distribución celular relativamente restringida. Los niveles basales de transcripción requieren los factores ets y Sp1, pero la restricción de la expresión que ocurre por ejemplo en las células endoteliales, involucra a muchas regiones de regulación (Graulich y cols., 1999).

El TGF- β aumenta la expresión de endoglina, lo que requiere los factores Sp1 y Smad 3 y/o 4 (Botella y cols., 2001). También se ha demostrado que la hipoxia es un potente estimulador de la expresión del gen de endoglina en células endoteliales, siendo este efecto potenciado por TGF- β (Sánchez-Elsner y cols., 2002).

6.5. Endoglina y telangiectasia hemorrágica hereditaria

El gen que codifica para endoglina se encuentra en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34) (Fernández-Ruiz y cols., 1993). Las mutaciones en este gen son responsables de una alteración vascular conocida como telangiectasia hemorrágica hereditaria de tipo 1 (HHT-1) o síndrome de Rendu-Osler-Weber (McAllister y cols., 1994). Las mutaciones que se han identificado están distribuidas por todo el dominio externo de endoglina, y parece que esas mutaciones producen formas truncadas de la proteína (Pece-Barbara y cols., 1999; Paquet y cols., 2001; Shovlin, 1997). Los individuos afectados por la enfermedad (1:10000) presentan una reducción en los niveles de endoglina (haploinsuficiencia) con respecto a los individuos sanos (Paquet y cols., 2001; Pece y cols., 1997; Shovlin y cols., 1997; Gallione y cols., 1998).

La HHT-1 es una displasia vascular autosómica dominante asociada en la mayoría de los pacientes con frecuentes epistaxias, sangrados

gastrointestinales y telangiectasias en la piel y las mucosas. En el 15-20% de los casos, la enfermedad cursa además con malformaciones arteriovenosas en el cerebro, el pulmón y el hígado (Guttmacher y cols., 1995; Shovlin, 1997; Shovlin y Letarte, 1999). A nivel microscópico, las lesiones vasculares de la HHT-1 se caracterizan por la dilatación de las vénulas postcapilares que se conectan directamente con las arteriolas, con lo cual los capilares desaparecen (Figura 16). A estas alteraciones hay que añadir un engrosamiento de la pared de los vasos con infiltración de células mononucleares y proliferación de las células del músculo liso vascular (Braverman y cols., 1990). Los síntomas de esta enfermedad indican la importancia que tiene la expresión de unos niveles correctos de endogлина en el mantenimiento de la integridad de la vasculatura (Bourdeau y cols., 2000 a), proceso en el que TGF- β interviene como un potente regulador (Li, C. y cols., 2001). Aunque no se conoce la función específica de endogлина en estos procesos, es evidente que está relacionada con el mecanismo de señalización de TGF- β ya que mutaciones en el gen ALK-1, altamente expresado en células endoteliales, producen otra enfermedad (HHT-2) con alteraciones similares en los vasos (Johnson y cols., 1996).

El mecanismo exacto de las anomalías vasculares de la HHT no se conoce todavía (van den Driesche y cols., 2003; Lamouille y cols., 2002; Goumans y cols., 2002). No obstante, parece ser que se produce un descontrol en el balance entre el crecimiento de los vasos y su maduración, el cual causa la fusión del plexo capilar en vasos cavernosos y la hiperdilatación de vasos largos (Srinivasan y cols., 2003) (Figura 16).

La generación de ratones heterocigotos para endogлина (*Eng*^{+/-}), los cuales sólo tienen un alelo para la proteína, ha permitido el desarrollo de un modelo experimental de HHT-1 (Bourdeau y cols., 1999; Bourdeau y cols., 2000 b). En ocasiones, estos animales presentan las manifestaciones clínicas de la HHT (Bourdeau y cols., 1999; Bourdeau y cols., 2000 b; Satomi y cols., 2003; Torsney y cols., 2003), lo que indica que los niveles de endogлина en el endotelio son críticos para el mantenimiento de la estructura y la función vascular. El entendimiento del papel que juega la endogлина en la función endotelial es determinante a la hora de encontrar terapias que corrijan la HHT-1.

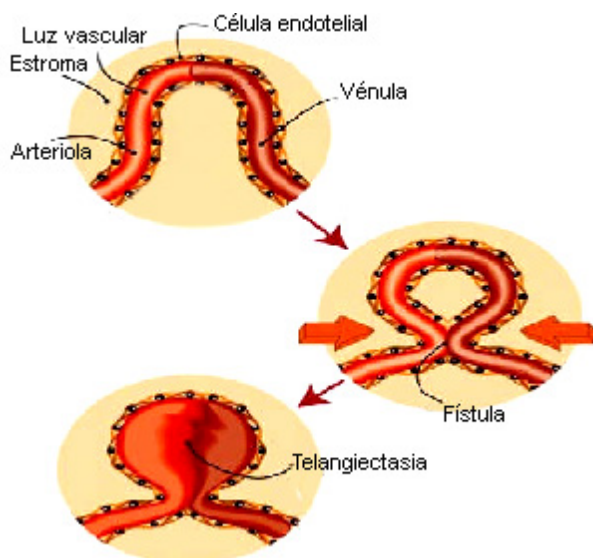


Figura 16: Proceso de formación de una telangiectasia (modificado de McAllister y cols., 1994).

6.6. Endogлина y angiogénesis

Varias líneas de investigación han puesto de manifiesto la función de endogлина en la angiogénesis, en el desarrollo cardiovascular y en el remodelado vascular (Fonsatti y cols., 2001; Duff y cols., 2003). La expresión de endogлина en las líneas celulares presentes en la vasculatura (endotelio, músculo liso vascular y fibroblastos) así como la asociación de la HHT-1 con la expresión reducida de esta proteína (Marchuk, 1998), sugieren que los niveles de endogлина en estos tipos celulares son críticos para su función. Además, la endogлина se sobreexpresa en el endotelio cuando está activado (dañado), donde se la ha involucrado en múltiples respuestas celulares. La expresión de endogлина se regula durante el desarrollo del corazón (Vincent y cols., 1998; Qu y cols., 1998; Arthur y cols., 2000) y aumenta durante la formación de los tabiques y las válvulas cardiacas (Qu y cols., 1998). También se ha encontrado un incremento en la expresión de endogлина en tejidos en los que se está produciendo angiogénesis (Wang y cols., 1994; Krupinski y cols., 1994; Rulo y cols., 1995; Seon y cols., 1997; Kumar y cols., 1999), probablemente a través de un mecanismo mediado por la hipoxia (Sánchez-Elsner y cols., 2002).

Igualmente se produce una atenuación de la angiogénesis *in vitro* cuando se inhibe la expresión de endoglina (Li y cols., 2000). Por otra parte, se ha comprobado recientemente que la S-endoglina actúa como dominante negativo frente a la L-endoglina en angiogénesis y otros fenómenos (Pérez-Gómez y cols., en prensa).

Pero la función crucial de endoglina en la angiogénesis y la morfogénesis vascular se puso de manifiesto con los embriones *knockout* para endoglina, los cuales mueren entre los días 10-11.5 de gestación por deficiencias en el desarrollo vascular y cardíaco (Bourdeau y cols., 1999; Li y cols., 1999; Arthur y cols., 2000). Los animales *knockout* sufren fallos en el proceso de remodelado del plexo vascular primitivo, con lo que se originan unos vasos maduros muy frágiles que se rompen produciendo hemorragias internas. Estas deficiencias vasculares indican que la endoglina interviene en el proceso de formación de los vasos sanguíneos maduros. Los embriones *knockout* presentan también malformaciones en las válvulas cardíacas y en la tabicación del corazón, además de edema pericardiaco, indicando que la endoglina también desempeña una función importante en el desarrollo cardíaco.

Recientemente Lebrin y cols. (2004) han propuesto un modelo de regulación de la angiogénesis a través de endoglina. Según este modelo la endoglina es necesaria para que se produzca señalización a través de ALK-1. Como hemos visto anteriormente, el TGF- β 1 puede estimular dos tipos distintos de receptor I, con efectos opuestos en las células endoteliales. La señalización a través de ALK-5 produce inhibición de la proliferación y migración celular, mientras que la señalización a través de ALK-1 induce proliferación y migración de las células endoteliales. Estos autores proponen que la expresión de endoglina es la que regula por qué vía se produce la señalización. Así, en ausencia de endoglina la señal predominante se produce a través de ALK-5, lo que mantiene quiescente el endotelio. Cuando la expresión de endoglina es alta se estimula ALK-1 e indirectamente se inhibe la vía de ALK-5, promoviendo la angiogénesis (Figura 17). Además Blanco y cols. (2005) han demostrado la interacción de endoglina con ALK-1. Según este grupo, el dominio extracelular de endoglina contribuye a la cooperación funcional entre TGF- β y ALK-1. Por el

contrario, la endoglina parece interferir en la señalización a través de TGF- β /ALK-5.

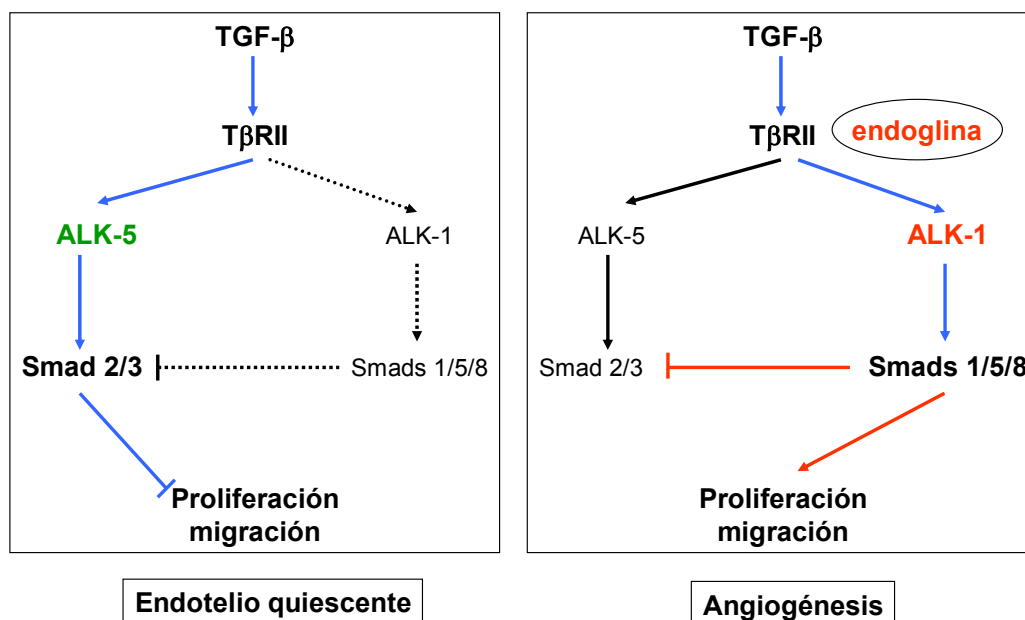


Figura 17.- Modelo de regulación de la angiogénesis a través de endoglina. En ausencia de endoglina la señalización de TGF- β se produce a través de ALK-5, lo que mantiene el endotelio quiescente. Cuando la expresión de endoglina es alta, la señalización de TGF- β se produce a través de ALK-1, lo que promueve la activación del endotelio (modificado de Lebrin y cols., 2004).

6.7. Endoglina y tumores

La noción de que la angiogénesis es crucial en el crecimiento y progresión de los tumores, así como la demostración de que la endoglina se sobreexpresa cuando el endotelio está proliferando y su función en la formación de los vasos, sugieren que la endoglina puede tener relevancia en el diagnóstico, pronóstico y terapéutica de las enfermedades cancerígenas (Fonsatti y cols., 2001; Duff y cols., 2003). Además, varios autores han demostrado que la expresión de endoglina se encuentra muy aumentada en la vasculatura de tumores sólidos (Burrows y cols., 1995; Wang y cols., 1993; Thorpe y Burrows, 1995). De hecho, en los vasos de tejidos adultos no malignos, incluyendo lesiones preneoplásicas, la expresión de endoglina es mucho más débil que en los vasos de los tumores y con frecuencia se

restringe a los capilares (Wang y cols., 1993; Fonsatti y cols., 2000). En estudios realizados en células endoteliales procedentes de vasos tumorales se ha encontrado una correlación entre el aumento en la expresión de endoglina y la proliferación, sugiriendo que la supresión de endoglina podría usarse como inhibidor de la angiogénesis tumoral (Miller y cols., 1999).

La relación de endoglina con los tumores no se debe únicamente a los procesos de angiogénesis, puesto que se ha comprobado que ciertos tipos de células tumorales expresan endoglina. Este es el caso de los melanomas (Altomonte y cols., 1996), coriocarcinomas (Letamendía y cols., 1998 b) y tumores de origen hematopoyético, en concreto de linajes monocíticos (Lastres y cols., 1996; Haruta y Seon, 1986) y de linfocitos B (Zhang y cols., 1996). El papel de endoglina en estas células se ha relacionado con la modulación de la respuesta antiproliferativa de TGF- β . La pérdida del efecto antiproliferativo de TGF- β es un punto clave en el desarrollo de muchos procesos tumorales (Serra y Moses, 1996). En este sentido se ha relacionado la sobreexpresión de endoglina en células mieloides tumorales con la pérdida del efecto antiproliferativo de TGF- β (Calabro y cols., 2003).

6.8. Endoglina y procesos de desarrollo y reparación

Aparte de los tumores sólidos, se ha encontrado sobreexpresión de endoglina en células endoteliales de embriones, tejidos en cicatrización, tejidos infartados, psoriasis, artritis reumatoide, aterosclerosis, nefritis crónica... (Roy-Chaudhury y cols., 1997; van de Kerkhof y cols., 1998; Conley y cols., 2000; Rulo y cols. 1995; Szekanecz y cols., 1995). Algunas investigaciones recientes de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto el papel de la endoglina en la modulación de la fibrosis que se produce en procesos de enfermedad renal progresiva (Rodríguez-Peña y cols., 2001; Rodríguez-Peña y cols., 2002). Otros autores han demostrado la implicación

de la endogлина en otros procesos fibróticos (Leask y cols., 2002; Dharmapatni y cols., 2001).

La expresión de endogлина en fibroblastos y células estromales de diversos tejidos abrió diversas líneas de investigación para buscar una posible función de esta proteína en procesos de desarrollo y reparación (St-Jacques y cols., 1994; Robledo y cols., 1996; Rokhlin y cols., 1995; Qu y cols., 1998). Esta proteína puede estar implicada en la regulación de la proliferación y migración en respuesta a miembros de la familia de TGF- β (St-Jacques y cols., 1994). En este sentido, se ha demostrado que la incubación de células estromales humanas de médula ósea con anticuerpos anti-endogлина aumenta su proliferación (Rokhlin y cols., 1995).

6.9. Endogлина y óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es una de las moléculas más estudiadas desde los últimos veinte años, debido a las múltiples funciones fisiológicas en las que está implicado. Fue descubierto por Furchgott y Zawasky (1980), los cuales lo denominaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF), y más tarde se identificó como NO (Palmer y cols., 1987; Ignarro y cols., 1987). El NO es un agente vasodilatador que regula el tono vascular y por tanto la presión arterial. Además se le han atribuido otras funciones que incluyen la regulación de la contractilidad cardíaca, la transmisión de señales entre neuronas, la formación de memoria a corto plazo, la eliminación de agentes patógenos como bacterias y parásitos, la reducción de la agregación plaquetaria y el aumento en la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, entre otras (Lowenstein y cols., 1994; Moncada y Higgs, 1993; Poss y cols., 1995).

La biosíntesis del NO está catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Ignarro, 1996; White y Marletta, 1992), una enzima oxidativa que sintetiza este gas a partir de L-arginina (Palmer y cols., 1988) (Figura 18). Existen al menos tres isoformas distintas de la enzima, codificadas por otros tantos genes: la NOS inducible (iNOS), cuya síntesis permite que los macrófagos produzcan el NO necesario para que se desencadenen

determinadas reacciones inmunológicas; la NOS endotelial (eNOS), que produce el NO que relaja la musculatura de los vasos sanguíneos; y la NOS neuronal (nNOS) que produce el NO que interviene en la comunicación intercelular. Tanto la eNOS endotelial como la nNOS son constitutivas (Shulz, 1995). Una vez sintetizado, el NO difunde rápidamente dentro y fuera de la célula, ya que no puede ser almacenado en ningún compartimento celular, actuando durante un tiempo muy corto y en un pequeño volumen de tejido (Lowenstein y cols., 1994). Por este motivo es la enzima que lo sintetiza, la NOS, la que está sometida a una regulación muy estrecha: por el nivel de calcio intracelular en el caso de las isoformas constitutivas y por citoquinas y endotoxinas en el caso de la isoforma inducible (Shulz, 1995).

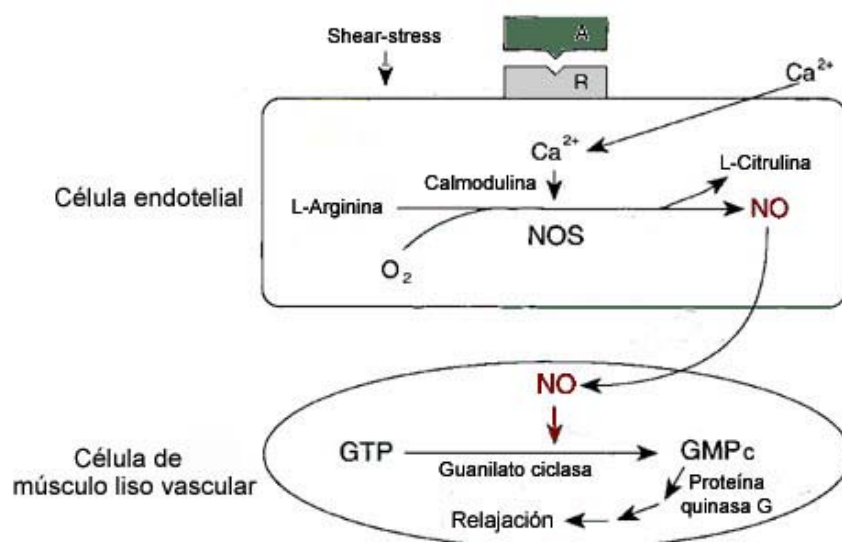


Figura 18. Relajación dependiente del NO derivado del endotelio. Los niveles de calcio intracelular aumentan en la célula endotelial por la acción de un agente A (acetilcolina, serotonina, sustancia P, bradiquinina...) que se une a su receptor de membrana (R) o bien por un efecto mecánico como el “shear stress”. El calcio activa la calmodulina, que a su vez activa la NOS, una oxigenasa que usando L-arginina como cosustrato, sintetiza NO. El NO difunde a las células del músculo liso vascular donde activa la guanilato ciclasa, que sintetiza GMPc a partir de GTP. El GMPc inicia el proceso de relajación del músculo liso vascular.

En el caso del endotelio, el NO sintetizado difunde hacia las células del músculo liso vascular adyacente (Figura 18). Dentro de ellas, se une al

hierro de la enzima guanilato ciclasa, activándola para catalizar la producción de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) a partir de guanosin trifosfato (GTP). El GMPc posee actividad de segundo mensajero, y activa diferentes procesos biológicos. En este caso produce dilatación en las arterias, ejerciendo su función a través de una cascada de proteínas quinasas que reducen el calcio intracelular modulando los canales de calcio de la membrana celular y el retículo sarcoplásmico (Ignarro y cols., 1981).

Además de NO, el endotelio vascular segrega otras sustancias vasoactivas, entre las que se incluyen la prostaciclina (PGI₂), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y la endotelina. El NO y PGI₂ se comportan como relajantes del músculo liso vascular, mientras que la endotelina 1 actúa como un potente vasoconstrictor. Se ha demostrado que la expresión de eNOS y endotelina 1 se incrementa en procesos como la reparación de heridas por la acción de TGF- β 1. Como la endogлина es un componente del sistema de receptores de TGF- β , capaz de modular respuestas específicas a este factor de crecimiento, es posible que una expresión reducida de endogлина pueda romper el balance de secreción endotelial de vasodilatadores y vasoconstrictores, predisponiendo al organismo a una dilatación de los vasos sanguíneos. Recientemente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la expresión reducida de endogлина va asociada a una reducción en la expresión de eNOS y en la producción de NO (Jerkic y cols., 2004). Según estos experimentos, la endogлина juega un papel muy importante en la vasodilatación mediada por NO, proceso regulado por la expresión de eNOS.

*No hay ningún viento favorable
para el que no sabe a que puerto se dirige*

Arthur Shopenhauer (1788-1860)

OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo fueron los siguientes:

1. Estudiar la implicación de endoglina en la angiogénesis del individuo adulto.
2. Investigar los mecanismos celulares mediante los cuales la endoglina participa en el proceso de angiogénesis.
3. Estudiar la implicación de endoglina en la reparación de heridas.
4. Investigar los mecanismos celulares mediante los cuales la endoglina participa en los procesos de reparación de heridas.
5. Analizar el papel del óxido nítrico en la regulación por endoglina de la angiogénesis y la cicatrización de heridas.

*Lo escucho y lo olvido.
Lo leo y lo recuerdo.
Lo hago y lo aprendo.*

Confucio (551-479 A.C.)

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Todos los reactivos, antígenos, anticuerpos, materiales y equipos utilizados en los métodos que se describen a continuación, están recogidos en los apéndices que se encuentran al final de este apartado de *Materiales y métodos*.

2. Animales de experimentación

2.1. Consideraciones previas

Los procedimientos empleados con los animales se aplicaron de acuerdo a las condiciones de experimentación y tratamiento de los animales de laboratorio dictadas por las siguientes instituciones nacionales e internacionales:

- Consejo de Europa, publicado en el Diario Oficial N. L358/1-358/6, 18 de Diciembre de 1986.
- Gobierno Español, publicado en el B.O.E. n° 67, pp. 8509-8512, 18 de Marzo de 1988 y B.O.E. n° 256, pp. 31349-31362, 28 de Octubre de 1990.
- Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicado por el Instituto Nacional de Salud de U.S.A. (publicación NIH N. 85-23).

2.2. Origen de los animales

Los ratones haploinsuficientes de endogлина (*Eng*^{+/-}) se generaron por recombinación homóloga usando células no diferenciadas (células madre) embrionarias de ratones 129/Ola, originadas según el procedimiento descrito por Bourdeau y cols. (Bourdeau y cols., 1999; Bourdeau y cols., 2000 b) y por cruce con la cepa C57BL/6. Los ratones *Eng*^{+/-} de la generación N4 fueron amablemente donados por la Dra. Michelle Letarte (Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá). Después se cruzaron de

nuevo con ratones C57BL/6, en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (PAE SA-001, Salamanca).

Para la realización de estos estudios se utilizaron ratones *Eng*^{+/-} así como sus hermanos de camada controles *Eng*^{+/+} de las generaciones N5 y N6. Los ratones *Eng*^{+/-} no mostraron signos clínicos evidentes de telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT), en contraste con los de la cepa 129/Ola (Bourdeau y cols., 2000 b; Torsney y cols., 2003). El genotipo de cada animal se determinó mediante el análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN aislado de las colas, utilizando dos tipos de cebadores que amplifican un fragmento de 470 pb del alelo mutado y un fragmento de 300 pb del alelo salvaje respectivamente (Bourdeau y cols., 1999; Rodríguez-Peña y cols., 2002).

Los estudios se realizaron con ratones de ambos géneros igualmente distribuidos, de 4-6 meses de edad y de un peso aproximado de 20-25 g. Los experimentos con los animales *Eng*^{+/-} y sus respectivos controles *Eng*^{+/+} se diseñaron en paralelo y se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo.

2.3. Dieta y condiciones ambientales

Los animales se mantuvieron en el animalario del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Allí permanecieron en jaulas donde tenían libre acceso a la comida y al agua. La alimentación fue a base de una dieta estándar cuyo análisis es el siguiente: humedad 12%, proteínas 15.4%, grasas 2.9%, glúcidos 60.5%, fibra 3.9% y minerales 5.3%.

Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes: temperatura de 20°C, humedad ambiental del 60% y fotoperiodo de 12 horas. Además el animalario cuenta con sistemas para la renovación y filtración del aire así como para la filtración de olores.

3.- Extracción de tejidos

Para analizar la expresión de endoglina y eNOS en pulmón y riñón, se sacrificaron algunos animales *Eng^{+/+}* y *Eng^{+/-}*. Los ratones se anestesiaron por inhalación con isoflurano/oxígeno, se les practicó una laparotomía media y se extrajeron rápidamente los riñones y pulmones. Las muestras de cada tejido se lavaron con solución salina tamponada con fosfatos (PBS) (NaCl 0.81%; KH₂PO₄ 2.6 mM; Na₂HPO₄ 4.1 mM) con el fin de eliminar los restos de sangre. Después se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C para la posterior extracción de proteínas y ARN.

4.- Ligadura de la arteria femoral

4.1. Procedimiento quirúrgico

Los animales *Eng^{+/+}* y *Eng^{+/-}* se anestesiaron por inhalación con isoflurano/oxígeno y se les rasuró la pata trasera izquierda. A continuación se realizó una pequeña incisión a cada ratón más o menos en el centro de la cara interna del muslo, a través de la cual se aisló la arteria femoral izquierda mediante disección roma. Una vez aislada, se obstruyó completamente a unos 2-3 mm del ligamento inguinal, mediante una ligadura con seda quirúrgica (6-0) (Couffinhal y cols., 1998). Se cerraron las heridas y los animales se devolvieron a las jaulas, donde se recuperaron de la intervención. A las veinticuatro horas de la intervención, todos los animales estaban completamente recuperados y no presentaban signos de necrosis tisular.

4.2. Monitorización del flujo sanguíneo

A los 1, 4, 7, 14, 21 y 28 días de la intervención quirúrgica se monitorizó el flujo sanguíneo en las patas traseras. Para ello se volvieron a anestesiarse los animales con isoflurano y se les rasuraron ambas patas. La perfusión en la pata se midió con un sistema de flujometría por laser Doppler, una técnica electro-óptica no invasiva que permite registrar

semicuantitativamente el flujo sanguíneo. Para realizar medidas de flujo se colocó una sonda óptica de 0,45 mm de diámetro perpendicular a la superficie de la piel. El flujómetro emite una luz monocromática de rayos láser, la cual es transmitida a través de la piel y reflejada por las partículas con las que choca otra vez hacia el flujómetro. El movimiento de glóbulos rojos produce una frecuencia de cambio de la luz reflejada (efecto Doppler), mientras que las partículas estacionarias no producen este fenómeno. La frecuencia de cambio de la luz reflejada o la ausencia de este fenómeno, nos dan la medida del flujo sanguíneo. Para cuantificar estas medidas de flujo, las variaciones en la intensidad de luz inicial se transforman en variaciones de voltaje en un rango de 0-10 V. Así, un valor de perfusión de 0 V equivale a una perfusión del 0%, mientras que 10 V equivale al 100%. Se realizaron entre 20-25 medidas de flujo en cada pata y el análisis se llevó a cabo calculando la perfusión media en la pata isquémica, así como en la pata no-isquémica que nos sirvió como control. Con el fin de evitar las variaciones que se pueden producir con esta técnica a causa de la temperatura o la luz ambiental, los valores de porcentaje de perfusión en la pata izquierda (isquémica) se refirieron a los de la pata derecha (normal no-isquémica). Como perfusión sanguínea basal se tomaron las medidas realizadas un día antes de llevar a cabo la ligadura de la arteria femoral.

4.3. Inhibición de la síntesis de NO

Para inhibir la síntesis de NO, los animales se trataron con N-Nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME) en el agua de bebida a la dosis de 10 mg/Kg/día. El L-NAME se administró diariamente desde el día previo a practicar la ligadura de la arteria femoral, hasta el final del periodo de reperfusión monitorizado (28 días tras la ligadura de la arteria).

4.4. Extracción del tejido muscular

En condiciones basales, así como a los cuatro días de producir la isquemia, algunos animales de cada grupo experimental se sacrificaron para recoger los músculos aductores y realizar con ellos estudios

inmunohistoquímicos y para extraer proteínas y ARN. Para ello se anestesiaron por inhalación con isoflurano/oxígeno y se extrajeron rápidamente los músculos aductores de ambas patas (isquémica y no-isquémica). Para los estudios inmunohistoquímicos, los tejidos se fijaron inmediatamente con formaldehído tamponado al 4%. Para la posterior extracción de proteínas y ARN, las muestras de tejido se lavaron con PBS con el fin de eliminar los restos de sangre. Después se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su uso.

4.5. Extracción de plasma

Al final del periodo de reperfusión monitorizado (veintiocho días tras la isquemia) se sacrificaron algunos animales de cada grupo para la obtención de muestras de plasma. Los animales se anestesiaron por inhalación con isoflurano/oxígeno y se recogió la sangre con una jeringuilla previamente heparinizada por punción de la vena cava en su bifurcación. Después se centrifugaron los tubos durante cinco minutos a 11000g, se recogió el plasma y se congeló para la posterior determinación de nitritos.

5.- Heridas cutáneas

5.1. Procedimiento quirúrgico y obtención de curvas de cicatrización

Los animales *Eng^{+/+}* y *Eng^{+/-}* se anestesiaron por inhalación con isoflurano/oxígeno y se les rasuró el dorso. A continuación, se lavó la piel con povidona yodada y a cada ratón se le practicaron dos heridas circulares de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, una a cada lado de la columna vertebral. Consideramos que este es el sitio más idóneo para realizar las heridas por la dificultad del animal en alcanzar este lugar con la boca, lo que podría interferir en el proceso de cicatrización. Las heridas se realizaron cortando la piel con unas tijeras quirúrgicas. A continuación se colocó un plástico transparente encima de las heridas y con un rotulador de punta

finalmente se trazó el área exacta de las mismas. Después de la intervención se colocaron los animales en jaulas independientes para evitar mordeduras en las heridas. Cada dos días se volvieron a anestésiar con isoflurano y se trazó el área de cada herida en el plástico transparente. Cuando las heridas estuvieron totalmente cerradas, los trazados de las áreas se digitalizaron para su posterior análisis con el programa informático para PC *Scion Image* (Scion Corporation). Se expresó el cierre de cada herida en el tiempo como porcentaje del área de la herida original.

5.2. Inhibición de la síntesis de NO

Para inhibir la síntesis de NO, los animales se trataron con L-NAME en el agua de bebida a la dosis de 10 mg/Kg/día. El L-NAME se administró diariamente desde el día previo a practicar las heridas, hasta que éstas se habían cerrado completamente.

6. Cultivo de anillos de aorta

Este cultivo se llevó a cabo a partir de modelos descritos anteriormente (Brown y cols., 1996; Nicosia y Ottinetti, 1990; Lee y cols., 1999).

Previamente a realizar los experimentos todo el material quirúrgico se esterilizó, con el fin de mantener las mayores condiciones de higiene posibles y así evitar la contaminación de los cultivos.

Después de sacrificar el ratón mediante dislocación cervical, se practicó la extracción de la porción torácica de la aorta y se introdujo en solución de Hanks (NaCl 138 mM; CaCl₂·2H₂O 1.3 mM; KCl 5.4 mM; NaHCO₃ 4.2 mM; D-glucosa 1g/L; Na₂HPO₄ 0.3 mM; KH₂PO₄ 0.4 mM; MgSO₄ 0.2 mM; pH 7.4) esterilizada y suplementada con penicilina 5000 U/mL - estreptomina 500 µg/mL y anfotericina B 25 µg/mL. En la misma solución de Hanks, que conserva las células endoteliales y elimina posibles coágulos residuales, limpiamos la aorta bajo una lupa de diez aumentos. De esta manera eliminamos la adventicia. A continuación se realizaron

secciones de la aorta de aproximadamente 1 mm de grosor con la ayuda de dos hojas de bisturí. Obtuvimos entre seis y ocho anillos de aorta por ratón, los cuales se mantuvieron en solución de Hanks.

En la campana de flujo laminar vertical, se colocaron cubreobjetos de 20 x 20 mm en placas petri de 35 mm de diámetro. Sobre cada uno de los cubres se extendieron cuidadosamente 150 μ L de *Growth Factor Reduced Matrigel Matrix (Matrigel)* procurando obtener una capa lo más homogénea posible. El *Matrigel*, que se extrae de tumores Engelbreth-Holm-Swarm, es un gel compuesto por proteínas de la membrana basal (laminina, colágeno IV, entactina y heparán sulfato proteoglicano) en el cual se han eliminado casi totalmente los factores de crecimiento. Esta constitución del *Matrigel* permite que las células endoteliales puedan proliferar, migrar y formar pseudocapilares. En algunos de nuestros experimentos se añadieron al *Matrigel* alguno o varios de los siguientes factores de crecimiento: EGF (0.7 ng/mL), PDGF (12 pg/mL) y TGF- β 1 (0.6 ng/mL). El *Matrigel* se conserva a -20°C, a 4°C es líquido y a 37°C gelifica. Por este motivo, el día anterior a cada experimento se descongeló el *Matrigel* a 4°C y a esta temperatura (líquido) se le añadieron los factores de crecimiento correspondientes y se extendió sobre los cubres. Para evitar la gelificación del *Matrigel*, en este último paso tuvimos la precaución de mantener todo el material sobre hielo y las puntas de pipeta previamente enfriadas.

Una vez que el *Matrigel* estuvo extendido sobre los cubres, se secaron los anillos sobre un papel de filtro y con la ayuda de unas pinzas cada uno de ellos se colocó en un cubre, de tal manera que los anillos de aorta quedaron embebidos en *Matrigel*. Generalmente por cada ratón sacrificado se cultivaron seis anillos de aorta.

A continuación las placas petri se introdujeron en un incubador celular a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂ /95% aire. Transcurridos aproximadamente treinta minutos, una vez que el *Matrigel* se había gelificado, se añadieron a cada placa 3 mL de medio de cultivo, asegurándonos de que todo el *Matrigel* quedaba perfectamente cubierto por el medio. La composición del medio de cultivo utilizado fue la siguiente: DMEM/HAM F12 1:1, conteniendo un 20% de suero bovino fetal (SBF). En

algunos de los experimentos, además el medio contenía 100 µg/mL de suplemento para el crecimiento de células endoteliales (ECGS).

6.1. Seguimiento y cuantificación del crecimiento de los pseudocapilares

Cada día, a la misma hora, se tomaron fotografías de los anillos de aorta y de los pseudocapilares de células endoteliales que comenzaban a crecer a partir de ellos. Las fotografías se realizaron desde el día 0 (día del cultivo) hasta el día 9 (los pseudocapilares comenzaban a remitir sobre este día) con una cámara acoplada a un microscopio invertido de contraste de fases (x 40 aumentos). A continuación se digitalizaron las fotografías.

En la cuantificación del número de pseudocapilares se utilizó el programa para PC *Scion Image* (Scion Corporation), que nos permitió calcular el área que ocupaban los mismos en cada fotografía. A continuación, al valor del área obtenido se le restó el valor del área del anillo de aorta.

7. Obtención de cultivos celulares primarios

Todas las manipulaciones con cultivos celulares se realizaron en la campana de flujo laminar vertical y utilizando material estéril. Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37°C en atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ /95% de aire.

7.1. Cultivo primario de células endoteliales de aorta de ratón

7.1.1. Extracción de los pseudocapilares del *Matrigel*

A partir de los pseudocapilares que crecían en el *Matrigel* (descrito anteriormente), obtuvimos cultivos primarios de células endoteliales de

aorta de ratón (CEAR). La extracción de los pseudocapilares se realizó el día noveno después del cultivo del anillo de aorta.

En primer lugar, el anillo de aorta se retiró del *Matrigel* con unas pinzas extremando los cuidados para no arrastrar los pseudocapilares. Después de lavar con PBS frío, se añadieron sobre el *Matrigel* 500 μ L de *Matrisperse*, una solución que despolimeriza el *Matrigel* sin digestión enzimática. El *Matrisperse* permite recoger las células del *Matrigel* evitando cambios bioquímicos que las pudieran dañar. A continuación se separó el *Matrigel* del cubre con la ayuda de un rascador celular y se volcó la placa sobre un tubo en hielo. Se recogieron en un mismo tubo todos los pseudocapilares procedentes de un mismo ratón. Después de dejar reposar el tubo durante una hora para permitir que el *Matrisperse* disolviera completamente el *Matrigel*, se centrifugó a 600g durante cinco minutos y a 4°C. Con la centrifugación, las células que formaban los pseudocapilares formaron un pellet que se resuspendió en medio de cultivo (DMEM/HAM F12 1:1; SBF 10%; penicilina 500 U/mL - streptomicina 50 μ g/mL; anfotericina B 2.5 μ g/mL). Por último, las células endoteliales provenientes de cada ratón se sembraron en una placa petri de 60 mm de diámetro.

7.1.2. Seguimiento y condiciones del cultivo

Las células endoteliales que formaban los pseudocapilares se adhirieron a las placas antes del primer cambio de medio. Posteriormente las células se multiplicaron hasta alcanzar la confluencia. El medio de cultivo se renovó cada dos días.

Una vez que las células estuvieron confluentes en las placas de 60 mm, se realizó un pase a una placa de 100 mm usando el mismo medio de incubación. Cuando las células en las placas de 100 mm alcanzaron la confluencia se realizaron pases 1:4.

Obtuvimos así cultivos primarios de dos tipos celulares diferentes: CEAR procedentes de ratones haploinsuficientes en endogлина (*Eng*^{+/-}) y CEAR procedentes de ratones control (*Eng*^{+/+}). Para evitar la posible

variabilidad interindividual, se mezclaron los cultivos procedentes de dos o tres ratones (*Eng*^{+/+} o *Eng*^{+/-}) cuando estaban en pase 2-3.

Cada cultivo primario de CEAR se caracterizó en los pases 3, 6 y 9. En la caracterización se utilizaron criterios morfológicos (formación de monocapas confluentes con apariencia de adoquinado y formación de pseudocapilares cuando se siembran en *Matrigel*) e inmunológicos (expresión del factor von Willebrand, PECAM-1, la molécula de adhesión de las células vasculares (VCAM), eNOS, VEGF, actina y endogлина; también la expresión negativa de actina de músculo liso vascular).

Los experimentos se realizaron con células en pases tempranos (4-8).

7.2. Cultivo primario de fibroblastos de piel de ratón

Obtuvimos cultivos primarios de fibroblastos de piel de ratón (FPR) a partir de un método previamente publicado (Bradshaw y cols., 1999) y que se describe a continuación:

Todas las soluciones utilizadas en el cultivo contenían penicilina 50 U/mL - estreptomicina 50 µg/mL y anfotericina B 2.5 µg/mL. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, y a continuación se rasuraron y se rociaron con alcohol al 70%. Después la piel se aisló mediante disección roma y se incubó con una solución de tripsina 0.25% en PBS estéril. La tripsina se mantuvo durante una noche en agitación a 4°C. En la campana de flujo laminar, se eliminó la capa epidérmica con unas pinzas y la dermis se lavó con PBS y posteriormente se digirió a 37°C con una solución de colagenasa 0.25% en PBS. Después de dejar actuar a la colagenasa durante tres horas, se recogió el sobrenadante y se eliminaron los restos no disueltos que precipitaron. Por último, se hizo una centrifugación a 600g durante tres minutos, se resuspendió el precipitado y se sembró (medio de cultivo DMEM, SBF 10%, penicilina 500 U/mL - estreptomicina 50 µg/mL, anfotericina B 2.5 µg/mL). Se sembraron cinco placas petri de 100 mm de diámetro por ratón.

7.2.1. Seguimiento y condiciones del cultivo

A las cuarenta y ocho horas, cuando los fibroblastos ya se habían adherido a las placas, se renovó el medio de cultivo. Transcurridas otras veinticuatro horas (placas confluentes) se realizó un pase 1:1. Después el medio fue renovado cada dos días. Cuando las células alcanzaban la confluencia se hicieron pases sucesivos 1:4 para eliminar las posibles células contaminantes del cultivo, como son los queratinocitos.

Obtuvimos así cultivos primarios de dos tipos celulares diferentes: FPR procedentes de ratones haploinsuficientes en endoglina ($Eng^{+/-}$) y FPR procedentes de ratones control ($Eng^{+/+}$). Para evitar la posible variabilidad interindividual, se mezclaron los cultivos procedentes de tres ratones ($Eng^{+/+}$ o $Eng^{+/-}$) cuando estaban en pase 2-3.

Debido a que estas células pierden muchas de sus características con las duplicaciones, se trabajó siempre en un pase temprano: pase 4. Además, en cada cultivo de FPR en pase 4 se comprobó mediante Western blot que la relación de endoglina entre $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$ fuera la correcta (aproximadamente el doble de endoglina en los $Eng^{+/+}$ que en los $Eng^{+/-}$).

8. Técnicas básicas en cultivos celulares

8.1. Tripsinización celular

Las células endoteliales y los fibroblastos son células adherentes, y tanto para el mantenimiento de la estirpe celular como para la realización de los experimentos, las células se transfirieron al material de plástico adecuado (placas de pocillos, placas petri, cubreobjetos...). Se utilizó la técnica de la tripsinización celular para levantar las células adheridas al plástico y volverlas a resembrar.

Tras retirar el medio de cultivo con bomba de vacío, las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar completamente los restos de medio de cultivo que inactiva la tripsina. A continuación se añadió tripsina 0.5 g/L - ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) 0.2 g/L durante dos minutos para

romper los enlaces que unen las células a la superficie de las placas. La acción de la tripsina se detuvo con medio de cultivo, y a continuación las células se transfirieron a un tubo que se centrifugó a 300g durante tres minutos. El precipitado se resuspendió en la cantidad adecuada de medio de cultivo dependiendo de su posterior utilización. Si el experimento lo requería, en este punto se procedió al recuento celular.

8.2. Recuento del número de células

Las células destinadas a la realización de los experimentos, se contaron después de la tripsinización por microscopia óptica (microscopio invertido de contraste de fases) utilizándose una cámara de Neubauer. Después de tripsinizar, centrifugar y resuspender las células en medio de cultivo adecuado, se mezclaron 100 μ L de la suspensión celular con 100 μ L de trypan blue 0.4% en PBS. De esta forma excluimos del recuento aquellas células no viables, ya que sólo incorporan el colorante las células muertas o dañadas (que han perdido la integridad de la membrana plasmática).

9. Determinación de nitritos en plasma

Para determinar la concentración de nitritos en plasma se usó una técnica colorimétrica, muy sensible para los iones nitrito, basada en una modificación de la reacción de Griess (Griess, 1879) y adaptada a nuestras condiciones experimentales (Valdivielso y cols., 2001). El método se basa en que la reacción del reactivo de Griess (sulfanilamida 1% y N-(1-naftil)-etilendiamida 0.1% en ácido ortofosfórico 2.5%) con los nitritos es cuantificable a 540 nm de longitud de onda.

9.1. Reacción de Griess y lectura de las absorbancias

Para llevar a cabo la reacción, se añadieron 250 mL del reactivo de Griess a 500 mL de muestra y se incubó la mezcla durante quince minutos a temperatura ambiente. A continuación se leyó la absorbancia a 540 nm.

Los valores obtenidos se extrapolaron a una recta patrón previamente elaborada con concentraciones conocidas de nitrito sódico.

10. Inmunohistoquímica

10.1. Preparación de los tejidos

Después de la fijación con formaldehído tamponado al 4% durante al menos veinticuatro horas, los tejidos se deshidrataron en etanol de gradación creciente hasta el alcohol etílico absoluto y posteriormente en xileno. Después de la deshidratación se incluyeron en parafina en una estufa a 60°C durante veinticuatro horas, con lo que se obtuvieron bloques que se cortaron con un microtomo en secciones transversales de 3 µm de grosor. Por último, los cortes se depositaron en un portaobjetos.

10.2. Marcaje de las preparaciones

Los cortes se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en etanol de gradación decreciente. Posteriormente se lavaron con agua destilada durante cinco minutos y a continuación se realizó una digestión enzimática de cinco minutos con pepsina a 37°C seguida de un lavado de cinco minutos con PBS. Para inhibir la peroxidasa endógena se utilizó agua oxigenada al 3% durante diez minutos y nuevamente se realizó un lavado de cinco minutos con PBS. A continuación se incubaron los cortes una hora con suero bloqueante, para evitar un marcaje inespecífico. Se retiró el exceso de líquido que pudiera quedar en las preparaciones y se incubaron durante una hora con el anticuerpo primario (Tabla 1). Se realizó otro lavado de cinco minutos con PBS, y seguidamente los cortes se incubaron durante media hora con un anticuerpo secundario “multilink” y se volvió a lavar con PBS cinco minutos. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo terciario “multilink” conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante media hora y se lavaron de nuevo cinco minutos con PBS. A continuación se incubaron cinco minutos en una solución de diaminobencidina que se usó como cromógeno y se lavaron con agua otros

cinco minutos. Después se realizó una tinción de contraste de la muestra con hematoxilina. Por último se deshidrataron los cortes en alcohol de gradación creciente y se montaron con cubreobjetos mediante el medio específico de montaje Tissue-Tek®.

Se realizaron los correspondientes controles negativos (incubaciones en ausencia del anticuerpo primario) y un control de revelado.

Tabla 1. Proteínas analizadas por inmunohistoquímica

Proteína	Tejido	Anticuerpo primario
Endoglina	Músculo	AcM de ratón anti-humano, Clon SN6h, 1:400 en PBS
PECAM (CD31)	Músculo	AcM de ratón anti-humano, Clon JC70A, 1:40 en PBS
VEGF	Músculo	AcM de ratón anti-humano, Clon C-1, prediluido

AcM: anticuerpo monoclonal.

11. Análisis de la densidad capilar

La densidad de los capilares se cuantificó en las muestras de músculo esquelético obtenidas en los días 4, 14 y 28 después de practicar la ligadura de la arteria femoral, así como en condiciones basales. Los capilares se identificaron por la tinción inmunohistoquímica positiva para PECAM y por su morfología.

Se contaron los capilares en veinte campos de cada músculo fotografiados al microscopio óptico con un objetivo de veinte aumentos y una lente de cinco. Para evitar la subjetividad que puede darse con esta técnica, los capilares se contaron siempre por el mismo observador en un ensayo ciego al tratamiento. La densidad capilar se expresó como el número de capilares por milímetro cuadrado.

12. Inmunofluorescencia

12.1. Condiciones celulares

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 20 x 20 mm previamente horneados y colocados en placas de pocillos de 35 mm. Se sembraron aproximadamente 4000 células por cubre y se esperó al menos veinticuatro horas antes de iniciar el experimento, para que las células estuvieran adheridas.

12.2. Marcaje de las células

En primer lugar se retiró el medio de cultivo de los pocillos, se lavó con PBS y se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante diez minutos a temperatura ambiente. Se retiró el PFA y se realizaron dos lavados con PBS con iones calcio y magnesio (PBS-CM) (CaCl_2 1 mM y MgSO_4 1 mM en PBS). Entonces se permeabilizaron las células durante cinco minutos con una solución de Tritón X-100 0.1%, albúmina sérica bovina (BSA) 0.2% y azida sódica 0.05% en PBS-CM (Tabla 2). A continuación se bloqueó con suero de cabra al 10% en PBS-CM durante treinta minutos (Tabla 2). Después de retirar la solución de bloqueo los cubres se incubaron durante cinco minutos con NH_4Cl 50 mM, para secuestrar los restos de PFA, y a continuación se lavó dos veces con BSA 0.2% en PBS-CM. La incubación con el anticuerpo primario (Tabla 2) se mantuvo durante al menos una hora a temperatura ambiente y con agitación suave utilizando el anticuerpo correspondiente. Transcurrido el tiempo de incubación se lavó dos veces con PBS-CM y acto seguido se incubó durante treinta minutos y en oscuridad con el anticuerpo secundario adecuado (Tabla 2) conjugado con cianina 3 (CyTM3) o Alexa Fluor® 488.

Después de la incubación con el anticuerpo secundario se lavó dos veces con BSA 0.2% en PBS-CM y se tiñeron los núcleos incubando los cubres en una solución acuosa 1 μM de Hoechst 33258 durante unos segundos. En último lugar se montaron los cubres en un porta utilizando 15 μL de Mowiol 4-88.

Tabla 2. Proteínas analizadas por inmunofluorescencia

Proteína	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
# α -actina	Faloidina conjugada con Oregon Green 488, 1:20 en PBS a 4°C	(inmunofluorescencia directa)
#Actina de músculo liso vascular	AcM de ratón, Clon 1A4, 1:800 en PBS	IgG de cabra anti-ratón conjugado con Cy TM 3, 1:2000 en PBS/ IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 1:1000 en PBS
*Endoglina	AcM producido por el hibridoma de rata MJ7/18 en suero de cabra al 2%	IgG de cabra anti-rata conjugado con Cy TM 3, 1:1000 en suero de cabra al 2%
Factor von Willebrand	AcP de conejo anti-humano 1:800 en suero de cabra al 2%	IgG de cabra anti-conejo conjugado con Cy TM 3, 1:1000 en suero de cabra al 2%
*PECAM-1 (CD31)	AcP de cabra, 1:25 en suero de cabra al 2%	IgG de burro anti-cabra conjugado con Alexa Fluor® 488 1:500 en suero de cabra al 2%

*La células no se permeabilizan, ya que se trata de una proteína de membrana. #No es necesario el bloqueo. AcM: anticuerpo monoclonal. AcP: anticuerpo policlonal.

12.3. Análisis de las preparaciones

Después de dejarlas secar durante al menos doce horas en la oscuridad y a 4°C, las preparaciones se analizaron con un microscopio óptico de fluorescencia configurado con los filtros de excitación de fluorescencia para Hoechst, CyTM3 o Alexa Fluor® 488. Las fotografías se tomaron con una cámara digital acoplada al microscopio de fluorescencia utilizando el programa *Vin view* (Roper Scientific) y se montaron con el programa *Spot 3.04* (Diagnostic Instrument).

Para obtener imágenes de secciones longitudinales de las preparaciones, éstas se analizaron con un microscopio confocal.

13. Western blot

13.1. Obtención de extractos de proteínas tisulares

Durante todo el proceso se trabajó a 4°C para evitar la degradación proteica. A cada muestra (100 mg) de músculo esquelético o pulmón se le añadió 1 mL de tampón de lisis (NaCl 140 mM, AEDT 50 mM, glicerol 10%,

Igepal CA-630 1%, Tris base 20 mM, pH 7.5) al que se habían añadido los inhibidores de proteasas aprotinina (0.1 µg/mL) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1 mM). A continuación se trituró el tejido en un homogenizador y se centrifugó a 20000g durante veinte minutos. Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante (extracto de proteínas) y se guardó a -20°C hasta su uso.

13.2. Obtención de fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas renales

Durante todo el proceso se trabajó a 4°C para evitar la degradación proteica. Para la obtención de fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas, cada riñón se troceó sobre hielo seco y a una muestra (100 mg) se le añadió 1 mL de tampón de membranas (sacarosa 0.25 M, AEDT 10 mM, Tris base 10 mM, pH 7) con inhibidores de proteasas (aprotinina 0.1 µg/mL y PMSF 1 mM). Después se homogenizó el tejido con un potter y el lisado se centrifugó dos veces a 4000g durante diez minutos, recogiendo cada vez el sobrenadante. A continuación se centrifugó el sobrenadante a 21000g a 4°C durante dos horas. Se retiró el sobrenadante con la ayuda de una bomba de vacío y resuspendimos el precipitado (membranas plasmáticas) en tampón de lisis. Estas muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

13.3. Obtención de extractos de proteínas celulares

13.3.1. Condiciones celulares

Para determinar la expresión de proteínas celulares se sembraron las CEAR (80000 *Eng*^{+/+} y 100000 *Eng*^{+/-}) o los FPR (80000 *Eng*^{+/+} o *Eng*^{+/-}) en placas de 60 mm con medio de cultivo, SBF 10%. Se dejaron crecer las células durante al menos tres días en el caso de las CEAR y dos días en el caso de los FPR. Cuando las células estuvieron en subconfluencia se lisaron para obtener extractos celulares.

13.3.2. Lisado celular

Durante todo el proceso se trabajó a 4°C para evitar la degradación proteica. Para recoger los extractos de proteínas celulares se lavaron las placas dos veces con PBS y se lisaron con tampón de lisis que contenía inhibidores de proteasas (pepstatina 1 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, aprotinina 1 µg/mL, PMSF 1 mM) y fosfatasas (ortovanadato sódico 0.2 mM). Se añadieron 150 µL de tampón de lisis por placa de 60 mm y se levantaron las células con ayuda de un rascador. A continuación, el lisado celular se centrifugó diez minutos a 10000g. Después de la centrifugación se recogió el sobrenadante y se guardó hasta su uso a -20°C.

13.4. Determinación de la concentración de proteínas

Para la cuantificación de la cantidad de proteínas totales en los extractos proteicos se siguió el protocolo del Kit comercial colorimétrico de Bio-Rad Laboratories, basado en el método de Lowry (Lowry y cols., 1951). Se utilizó un lector de placas de ELISA para la determinación de las absorbancias y los resultados se analizaron con el programa *KC-Junior* (BIO-TEK Instrument Inc.).

13.5. Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

La cantidad de extracto de proteínas analizado osciló entre 50 y 150 µg en el caso de los extractos tisulares y entre 5 y 20 µg en el caso de los celulares (Tabla 3). El volumen correspondiente se mezcló en proporción 1:1 con tampón de carga para electroforesis (dodecilsulfato sódico (SDS) 2%, glicerol 10%, Tris base 125 mM, azul de bromofenol 0.0005%, pH 6.8; en el caso de querer reducir las proteínas, el tampón de carga contenía además β-mercaptoetanol 1%). A continuación se desnaturalizaron las proteínas a 100°C durante tres minutos.

Posteriormente las proteínas se cargaron en un gel de tipo SDS-PAGE (dodecil sulfato sódico-gel de poliacrilamida para electroforesis). El gel de poliacrilamida (acrilamida 29.2%; N, N'-metilen-bis-acrilamida 0.8%)

utilizado constaba de dos secciones: una superior o gel de carga, con un 4% de poliacrilamida, y una inferior o gel separador, con un contenido de acrilamida que osciló entre el 6 y el 15%, dependiendo del peso molecular de la proteína estudiada (Tabla 3). La electroforesis se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 130 mV y en tampón de electroforesis (glicina 192 mM, SDS 0.1%, Tris base 25 mM, pH 8.3).

Las proteínas separadas e incluidas en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) en tampón de transferencia (glicina 190 mM, Tris base 20 mM, pH 8.3) a corriente constante de 400 mA y durante un tiempo comprendido entre 45-90 minutos, dependiendo de la anchura del gel (0.75-1.5 mm).

13.6. Bloqueo e incubación con los anticuerpos

Una vez concluida la transferencia, la membrana se lavó con tampón de lavado (Tween-20 0.1%, NaCl 150 mM, Tris base 20 mM, pH 7.5) e inmediatamente se incubó con tampón de bloqueo (BSA en tampón de lavado; la concentración depende de la proteína estudiada (Tabla 3)) durante al menos una hora a temperatura ambiente. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario a la dilución adecuada (Tabla 3) y en el tampón de bloqueo, durante al menos noventa minutos y a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación con el anticuerpo primario se hicieron tres lavados de siete minutos con tampón de lavado y posteriormente se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario (Tabla 3), una inmunoglobulina (IgG) conjugada con HRP durante treinta minutos. El anticuerpo secundario también se diluyó en el tampón de bloqueo a una concentración dependiente del tipo de anticuerpo. Al terminar se hicieron otros tres lavados de siete minutos con tampón de lavado.

Para la detección de las bandas se utilizó un sistema basado en la oxidación del luminol por las HRP y potenciado con p-iodofenol (Ausubel y cols., 1987). Las membranas se incubaron durante un minuto con los reactivos correspondientes (ECL). Inmediatamente y en la oscuridad se impresionó la membrana en una película y se introdujo en la máquina de

revelado. Por último, la película se digitalizó y se cuantificó la densidad óptica de las bandas obtenidas con el programa *Scion Image* (Scion Corporation).

Tabla 3. Proteínas analizadas por Western blot

Proteína	Carga (µg)	% gel	Bloqueo (% BSA)	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Actina (43 kDa)	15(E.C.)	10	1	AcP de conejo, 1:1000 en 1% BSA	IgG de cabra anti-conejo, 1:15000 en 1% BSA
Colágeno I de ratón (180 kDa)	20(E.C.)	10	5	AcP de conejo, 1:20000 en 5% BSA	IgG de cabra anti-conejo, 1:20000 en 5% BSA
CTGF (38 Kda)	15 (E.C.)	12	2	AcP de cabra, 1:1000 en 2% BSA	IgG de burro anti-cabra, 1:10000 en 2% BSA
*Endoglina de ratón (180 kDa)	50(E.T.) 15 (E.C.)	8	3	AcM producido por el hibridoma de rata MJ7/18, 1:4 en 3% BSA	IgG de cabra anti-rata, 1:10000 en 3% BSA
*Endoglina humana (180 KDa)	20 (E.C.)	8	3	AcM producido por el hibridoma de ratón TEA 1/58-1, 1:2 en 3% BSA	IgG de cabra anti-ratón, 1:15000 en 3% BSA
eNOS (NOS3) (145 kDa)	50(E.T.) 15(E.C.)	8	3	AcP de conejo, 1:1000 en 3% BSA	IgG de cabra anti-conejo, 1:15000 en 3% BSA
Factor von Willebrand (225 kDa)	15 (E.C.)	6	3	AcP de conejo, 1:1000 en 3% BSA	IgG de cabra anti-conejo, 1:15000 en 3% BSA
Fibronectina (220 Kda)	5 (E.C.)	6	3	AcP de conejo, 1:20000 en 3% BSA	IgG de cabra anti-conejo, 1:20000 en 3% BSA
p-eNOS (p-NOS3) (145 kDa)	150(E.T.)	8	3	AcP de cabra, 1:1000 en 3%BSA	IgG de burro anti-cabra, 1:10000 en 3% BSA
PECAM-1 (130 kDa)	15 (E.C.)	8	3	AcP de cabra, 1:1000 en 2% BSA	IgG de burro anti-cabra, 1:10000 en 2% BSA
α-tubulina (60 kDa)	50 (E.T.) 10 (E.C.)	12	1	AcM de ratón, 1:5000, en 1% BSA.	IgG de cabra anti-ratón, 1:10000 en 1% BSA
VCAM (90 kDa)	15 (E.C.)	12	3	AcP de cabra, 1:1000 en 1% BSA	IgG de burro anti-cabra, 1:2000 en 1% BSA
VEGF (45 kDa)	150(E.T.) 20(E.C.)	15	2	AcP de cabra, 1:80 (E.T.), 1:1000(E.C.) en 2% BSA	IgG de burro anti-cabra, 1:10000 en 2% BSA

Todos los anticuerpos secundarios están conjugados con HRP. * Las muestras se prepararon en condiciones no reductoras, es decir tampón de carga sin β-mercaptoetanol y las muestras no se hirvieron. E.C.: extractos celulares. E.T.: extractos titulares. AcM: anticuerpo monoclonal. AcP: anticuerpo policlonal.

13.7. Reutilización de las membranas

Algunas de las membranas de Western blot se reutilizaron para el análisis de otras proteínas. Antes de reincubar una membrana con otros anticuerpos, se la sometió durante quince minutos a un lavado con un kit comercial de reciclado de Western blot. A continuación se incubó con la solución de bloqueo y se siguió el protocolo normal de Western blot.

14. Northern blot

14.1. Extracción de ARN del tejido muscular

La extracción de ARN del tejido se realizó utilizando el reactivo comercial *Tri Reagent*, basado en el método del tiocianato de guanidinio/fenol/cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para evitar la degradación del ARN, todo el proceso se llevó a cabo a 4°C y se trabajó con material de vidrio horneado a 160°C, el de plástico autoclavado y las soluciones utilizadas se trataron previamente con dietil-pirocarbonato (DEPC) 0.1%.

En primer lugar se homogenizaron sobre hielo seco unos 100 mg de tejido en 1 mL del reactivo comercial con un homogenizador. Los homogenados se incubaron durante cinco minutos para que los complejos nucleoproteicos se disociaran completamente. Después se añadieron 0.2 mL de cloroformo a cada homogenado y se agitaron durante unos quince segundos vigorosamente. A continuación, se incubaron durante quince minutos y se centrifugaron a 12000g durante otros quince minutos. La fase acuosa (superior) se recogió en otro tubo y el ARN se precipitó con 0.5 mL de isopropanol durante diez minutos. Después los tubos se centrifugaron a 12000g durante ocho minutos, se desechó el isopropanol y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70% centrifugándose a 7500g durante cinco minutos. Por último, se añadió al precipitado 15 µL de agua y se incubó durante diez minutos a 55°C para su completa disolución. Las muestras de ARN se guardaron a -20°C hasta su uso.

Para la cuantificación del ARN total de las muestras se midió la absorbancia con un espectrofotómetro a 260 nm. La concentración de ARN se calculó teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/mL de ARN. Por último, se calculó la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm. Esta relación (A_{260}/A_{280}) se mantuvo en todos los casos entre 1.6-1.9, lo que indica la ausencia de contaminación proteica en las muestras.

14.2. Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

Cada muestra de 20 µg de ARN se llevó a un volumen de 10.5 µL y se le añadió un tampón de desnaturalización compuesto por 24 µL de formamida desionizada, 8.65 µL de formaldehído 37% y 4.8 µL de tampón MOPS (sal sódica del ácido morfolino-propenosulfónico) (MOPS 0.2 M, acetato sódico 0.05 M, AEDT 0.01 M, pH 7.2). La mezcla se calentó durante diez minutos a 70°C y se le añadieron 4.5 µL de tampón de carga (Glicerol 50%, AEDT 1 mM). A continuación se separaron los ARN mediante electroforesis en un gel desnaturalizante (formaldehído 0.66 M) de agarosa al 1%. La electroforesis se realizó a 60 mV en un tampón MOPS (MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM y AEDT 1 M, pH 7.2).

La transferencia se realizó en solución salina concentrada (SSC) (NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M, pH 7) a una membrana de nylon. La transferencia se realizó por capilaridad, a través de un puente de papel Whatman en contacto con la SSC y con el gel. Después de dieciséis horas de transferencia el ARN se fijó covalentemente a la membrana con luz UV durante unos veinte segundos. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente hasta su utilización.

14.3. Preparación de las sondas

Para la obtención de las sondas se aislaron fragmentos de ADN cíclico (ADNc) de sus vectores plasmídicos, por digestión con las endonucleasas de restricción adecuadas (Tabla 4). Posteriormente se

purificaron mediante el kit Geneglean® y se cuantificaron en un gel de agarosa al 1% utilizando un marcador (ADN del virus λ cortado con *Hind* III) de concentraciones conocidas.

Se marcaron 25-30 ng de las sondas con [³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol=110 TBq/mmol). Para realizar este marcaje se desnaturizó la sonda por calor y a continuación se añadieron los nucleótidos dATP, dGTP, dTTP y el marcado [³²P]-dCTP. Después se añadieron la solución *Reaction mix* y la enzima *Klenow* y se incubó a 37°C durante cuarenta y cinco minutos para que la formación de la cadena complementaria tuviera lugar. Todos los productos específicos mencionados formaban parte del Kit *Random Primed*. A continuación, las sondas se purificaron mediante precipitación con una mezcla de 40 μ L de acetato amónico 2.5 M, 150 μ L de etanol absoluto y 4 μ L de ARN de transferencia (ARNt) (1 mg/mL) durante diez minutos en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 13000g durante diez minutos a 4°C y el precipitado se disolvió en 50 μ L de agua destilada. A continuación se desnaturizó la sonda a 100°C durante diez minutos, quedando así preparada para la hibridación.

Tabla 4.- Sondas utilizadas

Sonda	Vector Plasmídico	Enzimas de restricción	Peso del inserto (pb)
COX-2	pCR 2.1-TOPO	BamHI	298
Endoglina	pBluescript M13	BamHI/AccI	938
eNOS	pBluescript	EcoRI	3600
TGF- β 1	pGEMT	EcoRI	451
VEGF ₁₆₅	pCIS.CXRNH	EcoRI	1200

La sonda de TGF- β 1 fue amablemente cedida por el Dr. Jean Pierre Girolami y Jean Loup Bascand (U388 INSERM, Toulouse, Francia). Como control interno de carga se utilizó una sonda específica contra la subunidad ribosomal 28S de 0.7 kb.

14.4. Hibridación

Las membranas se prehibridaron durante cuatro horas con el tampón de hibridación (sulfato de dextrano 10%, SDS 1%, NaCl 1 M) en un

horno a 60°C. A continuación se hibridaron con la sonda marcada en las mismas condiciones durante dieciséis horas. Después de la hibridación se lavó la membrana dos veces con una solución de lavado (NaCl 0.3 M, citrato sódico 0.03 M, SDS 1%, pH 7) durante treinta minutos a 60°C. Se realizó un último lavado con la misma solución diez veces diluida durante una hora y a temperatura ambiente.

Las bandas marcadas radiactivamente se detectaron mediante un PhosphorImager, utilizando el programa informático *Image Reader* (Fujifilm). Los análisis densitométricos de las bandas obtenidas se efectuaron con el programa de análisis de imagen *Mac-BAS* (Fujifilm). También se obtuvo una autorradiografía, exponiendo una película a -80°C que después se reveló. Por último, digitalizamos la autorradiografía y se cuantificó la densidad óptica de las bandas obtenidas con el programa *Scion Image* (Scion Corporation).

14.5. Reutilización de las membranas

Después de la hibridación con una sonda determinada, y antes de la hibridación con otra, se hizo un lavado de las membranas con una solución de lavado (AEDT 0.1 mM, pirofosfato sódico 0.025%, Denhardt's (Ficoll 0.02%, polivinilpirolidona 0.02%, BSA 0.02%) 0.001%, Tris base 2.5 mM, pH 8) a 70°C con el fin de eliminar la radiactividad.

15. ELISA de VEGF

15.1. Condiciones celulares, tratamiento y recogida de muestras

Del orden de 40000 CEAR *Eng^{+/+}* y 50000 *Eng^{+/-}* se sembraron en placas de seis pocillos con medio de cultivo, SBF 10%. Después de tres días (células en subconfluencia) se retiró el medio y se añadió medio nuevo con 2% suero, el cual se mantuvo durante dieciséis horas. A continuación se trataron las células con TGF- β 1 1 ng/mL o el anticuerpo neutralizante de

TGF- β 1 500 ng/mL y después de veinticuatro horas el medio se recogió para su inmediato procesamiento.

Las placas de pocillos se congelaron inmediatamente para la posterior cuantificación del ADN, y así poder corregir los resultados por el número de células.

15.2. Procesamiento de las muestras

Antes de comenzar el ensayo, las muestras se centrifugaron a 2000g durante diez minutos para precipitar y eliminar restos celulares que pudieran interferir en las determinaciones. Los procedimientos para la detección de VEGF se realizaron siguiendo las instrucciones del kit comercial *Mouse VEGF165 Immunoassay*. Se utilizó un lector de placas de ELISA para la determinación de las absorbancias y los resultados se analizaron con el programa *KC-Junior* (Bio-Tek, Instrument, Inc.).

16. Formación de pseudocapilares de CEAR en *Matrigel*

Esta técnica se llevó a cabo siguiendo una modificación del método descrito por Liu y cols. (2002).

Se extendieron 150 μ L de *Matrigel* (siguiendo el mismo protocolo descrito para el cultivo de anillos de aorta) sobre cubreobjetos de 18 x 18 mm depositados en placas de 35mm. A continuación se sembraron 300000 CEAR *Eng^{+/+}* o *Eng^{+/-}* sobre el *Matrigel*. Para ello se resuspendieron las células en 500 μ L de medio de cultivo, SBF 10% y por capilaridad se depositó la gota encima del *Matrigel*. Las placas se incubaron durante seis horas y pasado este tiempo se observó al microscopio óptico de contraste de fases la formación de estructuras tridimensionales en el *Matrigel* a partir de las células sembradas.

17. Determinación del ciclo celular mediante citometría de flujo

17.1. Condiciones celulares

Para la determinación del ciclo celular, las CEAR (200000 *Eng*^{+/+} y 250000 *Eng*^{+/-}) o los FPR (200000 *Eng*^{+/+} o *Eng*^{+/-}) se sembraron en placas de 100 mm y en medio de cultivo, SBF 10%. Pasados al menos tres días (células en subconfluencia), las células se recogieron para su posterior pase por el citómetro.

17.2. Recogida de las células

Las células se levantaron con tripsina y a continuación se paró la reacción con PBS-CM (no utilizamos medio de cultivo porque es autofluorescente, y pueden quedar restos en las células que interfieren en el resultado final). El contenido de las placas se recogió en tubos para el citómetro y se hizo una centrifugación a 600g durante cinco minutos. Acabada la centrifugación se desechó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 500 µL de etanol al 50% y se mantuvieron a -20°C durante al menos una noche.

17.3. Tinción con yoduro de propidio y pase por el citómetro de flujo

Para realizar la tinción con yoduro de propidio, las células resuspendidas en etanol se centrifugaron durante cinco minutos a 200g. Se decantó el etanol y se lavaron las células con PBS. Para eliminar el PBS se realizó otra centrifugación de cinco minutos a 200g y se decantó el sobrenadante. A continuación las células se incubaron durante treinta minutos con una solución de yoduro de propidio (Triton X-100 0.1%, ARNasa A (previamente cocida para eliminar las ADNasas) 0.2 mg/mL, yoduro de propidio 0.02 mg/mL en PBS). Finalizada esta incubación las células se pasaron por el citómetro de flujo. La adquisición de los datos se

realizó con el programa informático *Cell Quest* (Becton Dickinson) y el análisis de los resultados con el *ModFitLT* (Verity Software).

18. Cuantificación del número de células por cristal violeta

Esta técnica, descrita por Drysdale y cols. en 1983, se fundamenta en la capacidad del colorante cristal violeta de fijarse a los núcleos celulares, de manera que puede establecerse una relación directa entre el número de células existentes y la cantidad de cristal violeta fijado.

18.1. Condiciones celulares

La técnica se llevó a cabo en placas de veinticuatro pocillos. Se sembraron 5000 células por pocillo en medio de cultivo con SBF 10% y se dejaron crecer durante ocho días. Con el fin de obtener una curva de proliferación, se hicieron tinciones con cristal violeta a los siguientes tiempos: 0, 2, 4, 6 y 8 días después de la siembra. Tomamos como “tiempo 0”, el tiempo que tardan las células en adherirse al plástico (veinticuatro horas después de su siembra).

18.2. Tinción de los núcleos y lectura de las absorbancias

Para realizar la tinción con cristal violeta, las células se lavaron con PBS y se fijaron con glutaraldehído 10% durante diez minutos. Tras la incubación las células se lavaron con PBS y los núcleos se tiñeron con 300 μ L de cristal violeta 0.2% durante treinta minutos en oscuridad. A continuación, las placas se lavaron repetidas veces con PBS hasta eliminar completamente el exceso de cristal violeta. Se dejaron secar durante una noche en oscuridad, y por último se añadieron 2 mL de ácido acético 10%, se homogeneizó cada pocillo y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de placas de ELISA. Los resultados se analizaron con el programa *KC-Junior* (Bio-Tek, Instrument, Inc.).

18.3. Curva absorbancia/número de células

Con el fin de poder determinar el número de células que correspondían a una determinada absorbancia, se sembraron cantidades crecientes de células en las placas de veinticuatro pocillos y a las veinticuatro horas se tiñeron con cristal violeta, siguiendo el mismo protocolo.

19. Reparación de “heridas” en la monocapa de células

19.1. Condiciones celulares

Las CEAR (200000 *Eng*^{+/+} y 250000 *Eng*^{+/-}) o los FPR (200000 *Eng*^{+/+} o *Eng*^{+/-}) se sembraron en placas de 100 mm con medio de cultivo (SBF 10%) y se dejaron crecer en el incubador. Cuando las placas estuvieron confluentes se cambió el medio por otro que contenía un 2% de SBF y se incubaron durante dieciséis horas.

19.2. Realización de las “heridas” y estudio de la migración celular

Transcurridas las dieciséis horas se hicieron “heridas” (zonas sin células) en la monocapa deslizando una punta de pipeta amarilla en línea recta desde un extremo al otro de la placa. Se realizaron seis “heridas” por placa, tres horizontales y tres transversales. Después de realizar las “heridas” las placas se lavaron dos veces con PBS para eliminar las células levantadas y se añadió medio nuevo, SBF 2%. A continuación en cada placa se eligieron veinticuatro puntos al azar y se visualizaron los campos elegidos en una pantalla acoplada al microscopio invertido de contraste de fases. En cada lado de la pantalla se midió el ancho de la “herida” (cuarenta y ocho medidas por placa en total). A las veinticuatro horas se volvieron a localizar al microscopio los mismos puntos y se midió de nuevo el ancho de la “herida”.

Según este método, la distancia migrada por las células corresponde al ancho de la “herida” a tiempo 0 (primera medida) menos el ancho de la “herida” a las veinticuatro horas (segunda medida). Los resultados se expresaron en tanto por ciento respecto a la “herida” inicial.

20. Migración celular a través de membranas

20.1. Siembra e incubación de las CEAR en los insertos

En primer lugar los insertos (membranas de polietileno tereftalato con poros de 8 μm de diámetro) se colocaron en placas de veinticuatro pocillos y se preincubaron con el medio de cultivo durante al menos una hora a 37°C, para que la membrana se humedeciera. Para la preincubación se añadieron en el pocillo 0.7 mL del medio al que queremos que las células migren (DMEM-HAMF12 1:1, SBF 10%), y en el inserto 0.2 mL del medio en el que se siembran las células (DMEM-HAMF12 1:1, SBF 2%). Después del periodo de preincubación se retiró el medio y se añadieron en cada inserto 100000 células en 0.2 mL de DMEM-HAMF12 1:1, SBF 2%. En el pocillo se mantuvo el medio de preincubación.

Con el fin de realizar un control de las células sembradas realmente en el inserto, se sembró el mismo volumen de células (0.2 mL) en un pocillo de una placa de veinticuatro. Con estas células seguimos el protocolo de tinción con cristal violeta a tiempo 0, ya explicado anteriormente.

Para permitir la migración celular a través de las membranas hacia el medio con SBF 10%, los insertos se incubaron durante dieciséis horas.

20.2. Fijación de las CEAR a la membrana, tinción de los núcleos y lectura de las absorbancias

Finalizado el periodo de incubación, los insertos se lavaron con PBS y se limpió la parte superior de la membrana con un bastoncillo de algodón, para eliminar las células que no habían migrado. A continuación, las

células que habían migrado (parte inferior del inserto) se fijaron con glutaraldehído 10% durante diez minutos. Una vez fijadas, se lavaron con PBS y se tiñeron los núcleos con cristal violeta 0.2% durante treinta minutos y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se lavaron los insertos repetidas veces con PBS para eliminar los restos de cristal violeta y se permitió que las membranas se secaran durante una noche en oscuridad. Por último, el color violeta que teñía los núcleos de las células fijadas a la parte inferior de la membrana se recogió con una gota de 0.1 mL de ácido acético. Recogida la gota con una pipeta, se colocó en un pocillo de una placa de noventa y seis para después leer la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 595 nm. Los resultados se analizaron con el programa *KC-Junior* (Bio-Tek, Instrument, Inc.). Con el fin de referir las células que habían migrado al número de células sembradas, las absorbancias obtenidas se corrigieron por las absorbancias resultantes de la tinción con cristal violeta de las células sembradas en pocillos como control de carga.

21. Incorporación de [³H]-prolina a proteínas colágenas

La incorporación exógena de prolina marcada con tritio ([³H]-prolina) se utilizó como índice de acumulación de proteínas colágenas en el medio de cultivo de las CEAR, siguiendo una modificación del método descrito por Riser y cols. (1998).

21.1. Condiciones celulares y tratamientos

La técnica se llevó a cabo sembrando las células en placas de veinticuatro pocillos. Se sembraron 11000 CEAR *Eng^{+/+}* y 9000 células *Eng^{+/-}* por pocillo y se dejaron crecer en DMEM-HAMF12 1:1, SBF 10%. A los tres días (células en subconfluencia) el medio utilizado se cambió por DMEM, SBF 2% (se utiliza DMEM porque no contiene prolina en su composición). Después de dieciséis horas se reemplazó el medio por DMEM, SBF 2% suplementado con β -aminopropionitrilo 0.148 mM (se utiliza para

impedir que el colágeno forme fibrillas y se deposite sobre la monocapa de células; de esta manera favorece que el colágeno permanezca en el medio de cultivo), ácido ascórbico 210 μM , prolina 183 mM y [^3H]prolina (actividad específica 60 Ci/mmol, 1 mCi/mL) 2 μCi /pocillo. El TGF- β 1 (1 ng/mL) o el anticuerpo neutralizante de TGF- β 1 (500 ng/mL) se añadieron al medio suplementado y se incubó durante veinticuatro horas.

21.2. Recogida de las muestras

Tras el periodo de marcaje, el medio de cultivo de cada pocillo se recogió en un tubo de 1.5 mL a los cuales se habían puesto previamente 165 μL de Inhibidor Universal de Proteasas frío (compuesto por PMSF 3 mM, N-etilmaleimida 40 mM y AEDT 0.1 mM). Las muestras se congelaron a -20°C hasta su utilización, o bien se procedió al procesamiento de las mismas.

Las placas de pocillos se congelaron a -20°C para después cuantificar el ADN y así poder corregir los resultados por el número de células presentes en cada pocillo.

21.3. Procesamiento de las muestras

Las proteínas del medio de cultivo se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 50% (concentración final 10%) al que previamente se añadió BSA (20 μL /muestra de un stock con concentración de 66 mg/mL) para favorecer la precipitación de las proteínas. A continuación, se centrifugó a 2000g y a 4°C durante diez minutos y se lavó el precipitado exhaustivamente con TCA al 10% frío para retirar el exceso de prolina marcada que no se había incorporado al colágeno. El precipitado se solubilizó añadiendo 1 mL de NaOH 0.1 N a 60°C , y se agitó hasta su total disolución. El contenido de cada tubo se transfirió a viales de polietileno a los cuales se añadieron 3.5 mL de líquido de centelleo. Los viales se agitaron y se dejaron aproximadamente doce horas en oscuridad. Por último, se midió la radiactividad de los viales en un contador de partículas β

acoplado a un ordenador, y mediante el programa *1400 DSA LSC* (Wallac) se analizaron los resultados.

22. Transfección celular con endoglina humana

Los FPR se transfectaron con endoglina humana (Letamendía y cols., 1998 b) con el reactivo de transfección jetPEI™, una polietilenamina lineal que compacta el ADN en complejos cargados positivamente, capaces de interaccionar con los proteoglicanos aniónicos de la superficie celular y penetrar en la célula por endocitosis.

22.1. Condiciones celulares

Del orden de 60000 FPR *Eng^{+/+}* o *Eng^{+/-}* se sembraron en placas de 60 mm con DMEM, SBF 10% y se dejaron crecer. Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 60% de confluencia se procedió a realizar la transfección.

22.2. Preparación de los complejos jetPEI™/ADN y procedimiento de transfección

En primer lugar, 5 µg de ADN de endoglina humana (vector pCHV5) se diluyeron en 250 µL de NaCl 150 mM. Por otra parte, 10 µL de la solución comercial jetPEI™ se diluyeron en 250 µL de NaCl 150 mM. A continuación, la solución de jetPEI™ se añadió sobre la de ADN. La solución resultante se agitó vigorosamente, y se incubó durante treinta minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos jetPEI™/ADN. Con las concentraciones utilizadas, se obtiene un balance iónico entre los cationes del jetPEI™ y los aniones del ADN favorable para la formación de los complejos. Una vez transcurridos los treinta minutos, se añadieron los 500 µL de jetPEI™/ADN en el medio de cultivo de las células (4 mL). Tras cinco horas de incubación (tiempo suficiente para la

penetración de los complejos jetPEI™/ADN en las células), se cambió el medio de cultivo por medio fresco para evitar, en la medida de lo posible, la citotoxicidad producida por el jetPEI™.

Paralelamente se siguió el mismo protocolo para la transfección de otra placa de células con el vector vacío, la cual nos sirvió como control.

Cuando las células alcanzaron la subconfluencia se lisaron siguiendo el protocolo de Western blot.

23. Cuantificación del ADN

El ADN celular se cuantificó tanto en los experimentos de ELISA como en los de incorporación de [³H]prolina a proteínas colágenas con el fin de corregir los resultados obtenidos por el número de células. El ADN cromosómico se detectó mediante la reacción de la difenilamina. Se trata de un ensayo colorimétrico en el que la difenilamina reacciona con la ribosa del ADN dando lugar a un compuesto de color azul (Wyllie y cols., 1980).

23.1. Reacción de la difenilamina y lectura de las absorbancias

Las placas de pocillos se descongelaron y las células de los pocillos se lisaron con 75 µL de tampón de lisis de ADN (Tris base 10 mM, AEDT 20 mM, Tritón X-100 0.5%, pH 8) en agitación constante durante quince minutos. Se añadió después al lisado la misma cantidad de ácido perclórico al 20% que de tampón de lisis y se hidrolizaron las muestras en una estufa a 80°C durante quince minutos. Al mismo tiempo se preparó una curva de calibrado con ADN de timo de ternera (0-15 µg/mL) en ácido perclórico al 10% y se hidrolizó de la misma manera que las muestras. Transcurrido el tiempo de hidrólisis, las placas se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante quince minutos. Después se añadió una cantidad de reactivo de difenilamina (paraldehído 0.01%, difenilamina 240 mM en ácido acético glacial) igual al volumen total, tanto en las muestras como en los puntos de

la recta de calibrado. Por último, se mezcló todo con una punta de pipeta y se incubó durante toda la noche a 30°C en oscuridad.

Después de la incubación durante toda la noche, los pocillos adquirieron una tonalidad azul cuya intensidad depende del contenido en ADN. Para la cuantificación se pasaron 200 µL del contenido de los pocillos a placas de noventa y seis pocillos y se leyó la absorbancia a 595 nm y 700 nm con un lector de placas de ELISA. La absorbancia a 595 nm es proporcional a la cantidad relativa de ADN en la muestra, mientras que la lectura a 700 nm se utiliza para corregir la turbidez de la muestra. Los resultados se analizaron con el programa *KC-Junior* (Bio-Tek, Instrument, Inc.).

24. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). En la experimentación *in vivo* se utilizaron al menos seis animales para cada grupo (n=6) y en la experimentación *in vitro* al menos tres (n=3). En los ensayos celulares de ELISA, proliferación, migración y formación de colágeno se utilizaron al menos tres pocillos/placas por experimento para cada grupo.

Se utilizó el test estadístico de la *t* de Student para determinar las diferencias significativas entre dos grupos de datos. Consideramos significativo un valor de “ $p < 0.05$ ”. El programa informático utilizado fue el *NCSS* (Statisticals Solutions).

Para analizar más de dos grupos de datos, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una entrada. Para evaluar la normalidad de los datos se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov. A continuación se aplicó el test de Scheffé cuando los datos presentaban una distribución normal y el de Kruskal-Wallis cuando no estaban normalmente distribuidos. Consideramos significativo un valor de “ $p < 0.05$ ” (test de Scheffé) y un valor de “ $z > 1.96$ ” (test de Kruskal-Wallis). El programa informático utilizado fue el *NCSS* (*Number Cruncher Statistical System*)(Statisticals Solutions).

Para comparar curvas se aplicó un modelo lineal general de medidas repetidas. Consideramos significativo un valor de “ $p < 0.05$ ” (test de Bonferroni). El programa informático utilizado fue el *SPSS (Statistical Package For the Social Sciences)*.

Apéndice 1. Relación de reactivos y productos

Reactivo/producto	Casa comercial
Acetato amónico	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Acetato sódico	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Ácido acético glacial	Probus S.A. (Barcelona)
Ácido ascórbico	Bio Media (Boussens, Francia)
Ácido ortofosfórico	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Ácido perclórico	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Acrilamida	Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.)
ADN de timo de ternera	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
AEDT	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Agarosa	Seakem®, Cambrex Bio Science (ME, U.S.A.)
β-aminopropionitrilo	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Anfotericina B	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Aprotinina	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
APS	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
ARNasa A	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania)
ARNt	Roche diagnostics Corporation S.L. (Barcelona)
Azida sódica	Panreac Química S.A. (Barcelona)
Azul de bromofenol	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
BSA	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
CaCl ₂	Panreac Química S.A. (Barcelona)
Citrato sódico	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Cloroformo	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Colagenasa	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Cristal violeta	Panreac Química S.A. (Barcelona)
DEPC	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
D-Glucosa	Panreac Química S.A. (Barcelona)
Diaminobencidina (Kit Dako Envision™+System, Peroxidase)	Dako (CA, U.S.A.)
Dieta estándar para ratones A04,	Panlab S.L. (Barcelona)
Difenilamina	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
ECGS	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
ECL (revelado Western blot)	Amersham Biosciences Europe GMBH (Barcelona)
EGF	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Etanol absoluto	Mallinckrodt Baker Inc. (Deventer, Holanda)
Etanol 96% Cuve®	Laboratorios Pérez Giménez (Córdoba)
Ficoll	Amersham Pharmacia Biotech AB (Suecia)
Formaldehído	Calbiochem®, Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Formaldehído tamponado 4%	Panreac Química S.A. (Barcelona)
Formamida desionizada	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Glicerol	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Glicina	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Glutaraldehído	Panreac Química S.A. (Barcelona)
Hematoxilina	BioGenex (CA, U.S.A.)
Heparina 1%	Altana Pharma (Madrid)
Hoechst 33258	Molecular Probes Europe BV (Leiden, Holanda)

Reactivo/producto	Casa comercial
[³ H]prolina	American Radiolabeled Chemicals, Inc (MO, U.S.A.)
Igepal CA-630	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Isoflurano (<i>Forane</i>)	Abbott Laboratories S.A. (Madrid)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
jetPEI™	PolyPlus-transfection (Illkirch, Francia)
KCl	Panreac Química S.A. (Barcelona)
KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Kit colorimétrico de detección de proteínas	Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.)
Kit GENECLEAN®	BIO101 Qbiogene Inc (Illkirch Cedex, Francia)
Kit de inmunoensayo para VEGF165 de ratón	R&D Systems Inc. (MN, U.S.A.)
Kit Random Primed	Roche diagnostics Corporation S.L. (Barcelona)
Kit de reciclado de Western blot RE-Blot Plus	Chemicon International, Inc. (CA, U.S.A.)
Leupeptina	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Líquido de centelleo Ecoscint A	National Diagnostic (Reino Unido)
L-NAME	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Marcador pesos moleculares BenchMark™	Invitrogen S.A. (Barcelona)
Marcador purificación sondas	Promega (Mannheim, Alemania)
<i>Matrigel</i>	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
<i>Matrisperse</i> (cell recovery solution)	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Medio de cultivo DMEM	Biowittaker™ Cambrex Bio Science (Verviers, Bélgica)
Medio de cultivo HAM F12	Biowittaker™ Cambrex Bio Science (Verviers, Bélgica)
β-mercaptoetanol	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Metanol	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Probus S.A. (Barcelona)
MOPS	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Mowiol 4-88	Hoechst AG (Frankfurt, Alemania)
NaCl	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
NaHCO ₃	Panreac Química S.A. (Barcelona)
Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
NaNO ₂	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
NaOH	Probus S.A. (Barcelona)
N-etilmaleimida	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
NH ₄ Cl	Panreac Química S.A. (Barcelona)
N-(1-naftil)-etilendiamida	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
N,N'-metilen-bisacrilamida	Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.)
Ortovanadato sódico	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Parafina	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Paraldehido	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
[³² P]-dCTP	Amersham Ibérica, S.A. (Madrid)
PDGF	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Penicilina-Estreptomina	Biowittaker™ (MD, U.S.A.)

Reactivo/producto	Casa comercial
Pepsina	BioGenex (CA, U.S.A.)
Pepstatina A	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Peróxido de hidrógeno	Panreac Química S.A. (Barcelona)
PFA	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Pirofosfato sódico	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
PMSF	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Polivinilpirolidona	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Povidona yodada (<i>Betadine</i>)	ASTA Médica, S.A. (Madrid)
Prolina	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Sacarosa	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
SBF	Gibco™, Invitrogen S.A. (Barcelona)
SDS	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Suero bloqueante	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
Suero de cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
Sulfanilamida	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Sulfato de dextrano (sal sódica)	Amersham Pharmacia Biotech AB (Suecia)
TCA	Panreac Química S.A. (Barcelona)
Temed	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
TGF-β1	R&D Systems Inc. (MN, U.S.A.)
Tissue-Tek®	Ted Pella, Inc (CA, U.S.A.)
Tripsina	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Tripsina-AEDT	Biowittaker™ (MD, U.S.A.)
<i>Tri Reagent</i>	Molecular Research Center, Inc. (OH, U.S.A.)
Tris base (Trizma®)	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Triton X-100	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Trypan blue	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Tween-20	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Xileno	Panreac Química S.A. (Barcelona)
Yoduro de propidio	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)

Apéndice 2. Relación de anticuerpos

Anticuerpo	Casa comercial/Procedencia
Ac anti-TGF- β 1	R&D Systems Inc. (MN,U.S.A.)
AcM anti-endoglina humana TEA 1/58-1 (hibridoma de ratón)	Bellón y cols., 1993
AcM anti-endoglina de ratón MJ7/18 (hibridoma de rata)	Ge and Butcher, 1994
AcM anti-macrófagos tipo iNOS	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
AcM de ratón anti-actina de músculo liso vascular, Clon 1A4	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
AcM de ratón anti-CD31 humano, Clon JC70A	Dako (CA, U.S.A)
AcM de ratón anti- endoglina humana, Clon SN6h	Dako (CA, U.S.A)
AcM de ratón anti- α tubulina	Oncogene Research Products (CA, U.S.A.)
AcM de ratón anti-VEGF humano, Clon C-1	Master Diagnóstica S.A. (Granada)
AcP de cabra anti-CTGF	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
AcP de cabra anti-PECAM1	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
AcP de cabra anti-pNOS3	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
AcP de cabra anti-VCAM	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
AcP de cabra anti-VEGF	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
AcP de conejo anti-actina	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
AcP de conejo anti-colágeno I de ratón	Chemicon International, Inc. (CA, U.S.A.)
AcP de conejo anti-fibronectina de ratón	Chemicon International, Inc. (CA, U.S.A.)
AcP de conejo anti-NOS3	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
AcP de conejo anti-vWF humano	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Ac secundario multilink	Master Diagnóstica S.A. (Granada)
Ac terciario multilink conjugado con HRP	Master Diagnóstica S.A. (Granada)
Faloidina conjugada con Oregon Green 488	Molecular Probes Europe BV (Leiden, Holanda)
IgG de burro anti-cabra conjugado con Alexa Fluor® 488	Molecular Probes Europe BV (Leiden, Holanda)
IgG de burro anti-cabra conjugado con HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
IgG de cabra anti-conejo conjugado con Cy TM 3	Jackson InmunoResearch laboratories Inc. (PA, U.S.A.)
IgG de cabra anti-conejo conjugado con HRP	Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.)
IgG de cabra anti-rata conjugado con Cy TM 3	Jackson InmunoResearch laboratories Inc. (PA, U.S.A.)
IgG de cabra anti-rata conjugado con HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc. (CA, U.S.A.)
IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor® 488	Molecular Probes Europe BV (Leiden, Holanda)
IgG de cabra anti-ratón conjugado con Cy TM 3	Amersham Biosciences Europe GmbH (Barcelona)
IgG de cabra anti-ratón conjugado con HRP	Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.)

Apéndice 3. Relación de material utilizado

Material	Casa comercial
Bastoncillos de algodón	Chicco (Madrid)
Cámara de Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Brunswick, Alemania)
Cubreobjetos	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Brunswick, Alemania)
Filtros de esterilización	Millipore Corporation (U.S.A.)
Hojas de bisturí	Steriler (Alemania)
Insertos para migración celular	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Jeringuillas	Ico (Italia)
Material quirúrgico	Lawton Medizintechnik (Alemania)
Membrana de Nylon Hybond-N	Amersham Biosciences Europe GmbH (Barcelona)
Membrana de PVDF	Pall Gelman Laboratory (FL, U.S.A)
Películas Fuji Medical X-Ray Film Super RX (para Western blot)	Fujifilm (Tokio, Japón)
Películas X-OMAT AR (para Northern blot)	Kodak (Madrid)
Placas de cultivo	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Plástico transparente	Apli® (Barcelona)
Portaobjetos	Menzel-Gläser® (Brunswick, Alemania)
Puntas de pipeta	Daslab (Madrid)
Rascadores celulares	Nunc A/S, (Roskilde, Dinamarca)
Seda quirúrgica	Braun-Dexon (Alemania)
Tubos de plástico 2 mL	Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania)
Tubos de plástico 50 mL	Falcon™, Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Tubos de polipropileno	Daslab (Madrid)
Tubos para el citómetro	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Viales de polietileno	National Diagnostic (Reino Unido)

Apéndice 4. Relación de equipos utilizados

Equipo	Casa comercial
Cámara Hitachi HP-110 acoplada al microscopio invertido	Hitachi (Tokio, Japón)
Cámara Nikon F601M acoplada al microscopio invertido	Nikon (Tokio, Japón)
Campana de flujo laminar TC-48 Gelaire	Cultek S.L. (Madrid)
Citómetro de flujo	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Contador β	Wallac 1409 DSA (Turku, Finlandia)
Crosslinker UV Strata-Linker 2400	Stratagene (CA, U.S.A.)
Equipo anestesia (isoflurano)	Ohmeda Medical (Reino Unido)
Equipo de Northern Blot Sub Cell™	Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.)
Equipo de Western blot Mini-Protean®II	Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.)
Espectrofotómetro UV-120-02	Shimadzu Corporation (Duisburg, Alemania)
Fuente de alimentación para electroforesis y transferencia Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.)
Homogenizador Polytron Netzgerät T8.01	IKA Labortechnik (Staufen, Alemania)
Horno de hibridación	Amersham Biosciences Europe GmbH (Barcelona)
Incubador celular Forma Scientific 3111	Forma Scientific (OH, USA)
Laser Doppler Periflux 2B	Perimed AB (Boras, Suecia)
Lector de placas de ELISA EL _x 800	BIO-TEK Instrument, Inc (VT, U.S.A)
Lupa Leica MZ6	Leica (Alemania)
Máquina de revelado M35 X-OMAT Processor	Kodak
Microscopio confocal Zeiss LSM510	Carl Zeiss Inc (NY, U.S.A.)
Microscopio óptico de fluorescencia Zeiss Axioplan2	Carl Zeiss Inc (NY, U.S.A.)
Microscopio óptico invertido de contraste de fases 2 EL WD 0.3	Nikon (Tokio, Japón)
Microscopio óptico leitz Laborlux S	Leitz (Alemania)
Microtomo Micron HM-310	Micron (Walldorf, Alemania)
PCR PTC-100TM	MJ Research Inc. (MA, U.S.A.)
PhosphorImager BAS-1500	Fujifilm (Tokio, Japón)
Potter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Alemania)
Videocámara ccd-iris acoplada al microscopio óptico	Sony (Barcelona)

*En lo tocante a la ciencia
la autoridad de un millar no es superior
al humilde razonamiento de una sola persona*

Galileo Galilei (1564-1642)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Expresión de endoglina en tejidos de ratones

Eng^{+/+} y *Eng*^{+/-}

Nuestro primer objetivo fue valorar la expresión de endoglina en tejidos de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Elegimos el pulmón y el riñón porque son tejidos muy vascularizados y la endoglina se expresa fundamentalmente en el endotelio vascular (Gougos y Letarte, 1988 a).

El ARN mensajero (ARNm) de endoglina determinado mediante Northern blot en los tejidos de animales *Eng*^{+/-} fue claramente inferior al encontrado en los tejidos de animales control (*Eng*^{+/+}) (Figura 1). Además, la proteína endoglina, detectada mediante Western blot en los extractos pulmonares y en las membranas plasmáticas renales de los animales *Eng*^{+/-}, fue menos de la mitad que la detectada en esos mismos tejidos de los animales *Eng*^{+/+} (Figura 2).

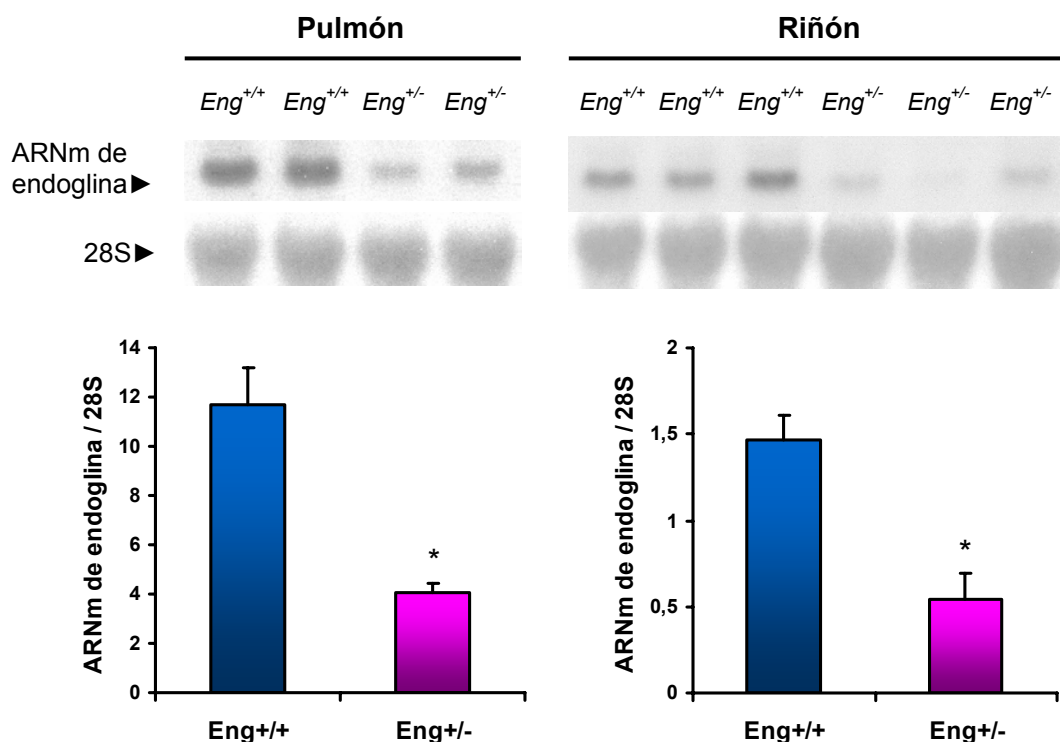


Figura 1. Expresión de ARNm de endoglina en tejidos de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. La determinación se realizó mediante Northern blot. Se usó como control interno de carga la subunidad ribosomal 28S. Los datos se expresan como la media ± EEM (n=6 animales). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: *p<0.05 vs ratones *Eng*^{+/+}.

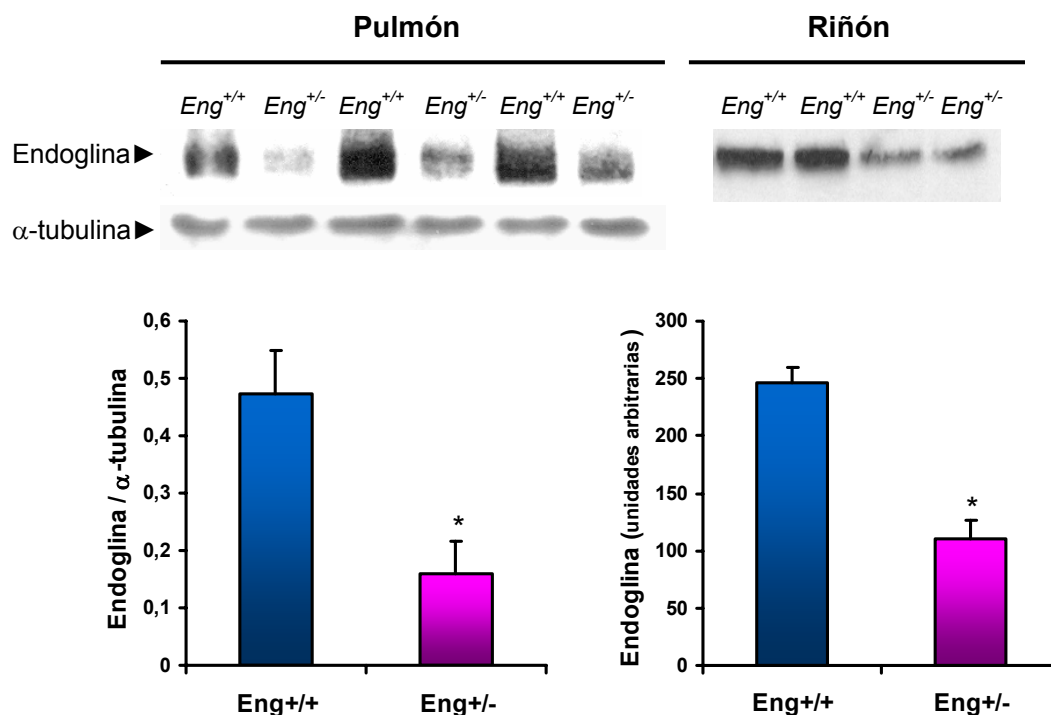


Figura 2. Expresión de endoglina en tejidos de ratones $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando el AcM anti-endoglina de ratón MJ7/18. Los datos se expresan como la media \pm EEM (n=6 animales). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: * $p < 0.05$ vs ratones $Eng^{+/+}$. **Izquierda.** Extractos pulmonares. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. **Derecha.** Extractos enriquecidos en membranas plasmáticas renales.

Estos datos confirman la haploinsuficiencia en endoglina de los ratones $Eng^{+/-}$. Similares resultados se han obtenido en otros estudios llevados a cabo en estos mismos tejidos (Rodríguez-Peña y cols., 2002).

Es importante resaltar el hecho de que los ratones $Eng^{+/-}$ expresan unos niveles menores de proteína endoglina, así como de su ARNm, que los ratones $Eng^{+/+}$. En algunos casos, la haploinsuficiencia en un gen no tiene un efecto último sobre los niveles de la proteína. Es el caso por ejemplo de ciertos ratones haploinsuficientes para eNOS ($eNOS^{+/-}$), en los que no se observa diferencia en la expresión de la proteína cuando se los compara con sus controles $eNOS^{+/+}$ (Kodja y cols., 1999).

La expresión reducida de endoglina que presentan los animales haploinsuficientes, hace que este modelo animal de ratones $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$ sea un modelo válido para analizar la implicación de endoglina en los

procesos angiogénicos y de cicatrización de heridas. Hay que recordar la imposibilidad de llevar a cabo estos estudios con ratones *knockout*, debido a que los animales sin endogлина (*Eng*^{-/-}) no son viables, puesto que mueren durante la gestación (Bourdeau y cols., 1999; Li y cols., 1999; Arthur y cols. 2000).

2. Angiogénesis post-isquémica en ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}

Aunque se sabe que la endogлина juega un papel importante en la regulación de la angiogénesis fetal (Bourdeau y cols., 1999; Li y cols., 1999; Arthur y cols., 2000) y se ha demostrado que su expresión se encuentra muy aumentada en la vasculatura de tumores sólidos (Burrows y cols., 1995; Wang y cols., 1993; Thorpe y Burrows, 1995), nunca se ha estudiado su contribución a la angiogénesis fisiológica.

En el presente trabajo estudiamos la implicación de endogлина en los fenómenos arteriogénicos y angiogénicos que tienen lugar en el remodelado vascular post-isquémico. Para ello utilizamos un modelo experimental de enfermedad arterial periférica: isquemia en la pata trasera producida por la ligadura de la arteria femoral. Este modelo experimental ha sido utilizado por otros autores para estudiar los procesos de remodelado vascular *in vivo* (Van Royen y cols., 2001 a).

La perfusión en las patas fue evaluada mediante laser Doppler en los días sucesivos a la ligadura de la arteria. Encontramos que la restauración de la perfusión fue significativamente más lenta en los ratones *Eng*^{+/-} que en los controles *Eng*^{+/+}. Al cuarto día de inducir la isquemia, la relación entre el flujo sanguíneo en la pata izquierda (isquémica) y la pata derecha (control contralateral) era de 0.28 ± 0.02 en los ratones *Eng*^{+/-}, mientras que en los *Eng*^{+/+} era de 0.36 ± 0.01 . Después de veintiún días, esta relación era de 0.54 ± 0.01 en el caso de los animales *Eng*^{+/-} y de 0.59 ± 0.01 en el caso de los *Eng*^{+/+}. No encontramos diferencias significativas en la perfusión tisular de los ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} veintiocho días después de inducir la isquemia (Figura 3).

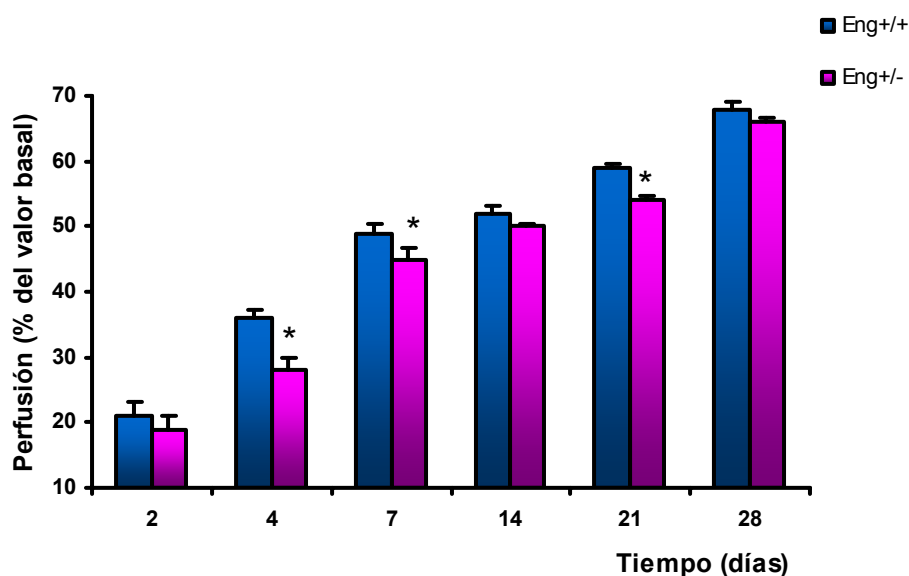


Figura 3. Evolución de la reperusión tisular tras la ligadura de la arteria femoral en los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. La perfusión se midió con un sistema de flujometría por laser Doppler. La perfusión en la pata isquémica se calculó como porcentaje de la perfusión en la pata no isquémica. Los datos se expresan como la media \pm EEM (n=10 animales). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: *p<0.05 vs animales *Eng*^{+/+} en el mismo tiempo.

Realizamos además un estudio inmunohistoquímico de PECAM (molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria) en cortes de los músculos aductores extraídos de los animales a los cuatro días de inducir la isquemia. El PECAM es un marcador característico del endotelio vascular (Garlanda y Dejana, 1997).

La expresión de PECAM en los músculos no-isquémicos era menor que en los isquémicos, tanto en los ratones control como en los haploinsuficientes (Figura 4). Además, observamos una reducción clara en la expresión de PECAM en los músculos isquémicos de los ratones *Eng*^{+/-} (Figura 4D), en comparación con la expresión en los músculos isquémicos de los ratones *Eng*^{+/+} (Figura 4B). En condiciones control, prácticamente no hay diferencias entre los músculos no-isquémicos de ambos tipos de animales (Figuras 4A y 4C).

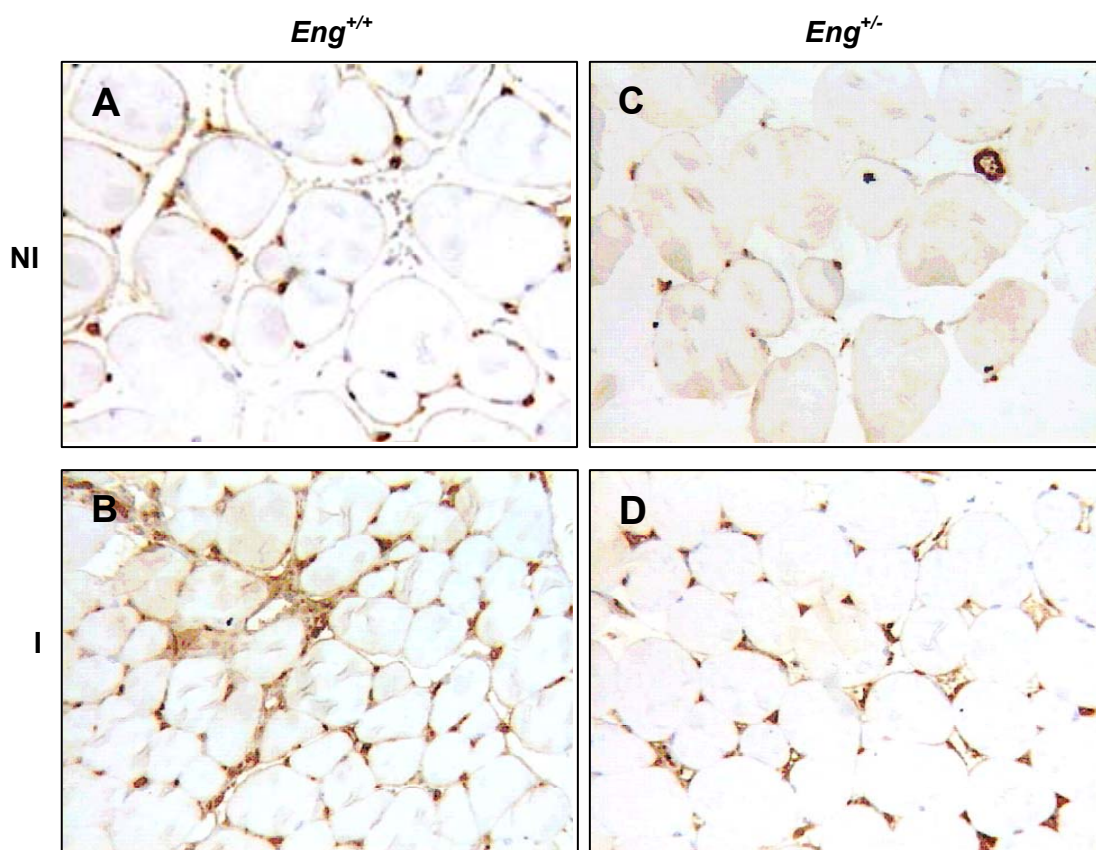


Figura 4. Expresión de PECAM en los músculos aductores de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} después de cuatro días de la ligadura de la arteria femoral. La determinación se realizó mediante inmunohistoquímica utilizando un AcM de ratón anti-PECAM humano, Clon JC70A. Imágenes tomadas al microscopio óptico (x 20 aumentos). NI: músculos no-isquémicos. I: músculos isquémicos.

El aumento en la expresión de PECAM refleja el aumento en el número de capilares, y por tanto se considera como un marcador de angiogénesis. La inmunoexpresión de PECAM se encuentra reducida en las preparaciones musculares de las patas isquémicas de los ratones haploinsuficientes en endogлина con respecto a los ratones controles. Por tanto, el presente resultado confirma el retraso en la reperusión tisular encontrado en los animales *Eng*^{+/-} con respecto a los *Eng*^{+/+}.

Evaluamos también la densidad capilar en preparaciones histológicas obtenidas de los músculos isquémicos de ambos tipos de animales. Localizamos los capilares en las preparaciones por su morfología así como por su tinción positiva para PECAM.

Los ratones haploinsuficientes presentaban una reducción significativa de la densidad capilar tras la isquemia en comparación con la densidad capilar de los animales control. Así, al cuarto día de inducir la isquemia, la densidad capilar en los músculos de los animales *Eng*^{+/-} era de 13 ± 2 capilares/campo, mientras que la de los animales *Eng*^{+/+} era de 21 ± 2 capilares/campo. Después de catorce días, contamos 19 ± 2 capilares/campo en los animales *Eng*^{+/-} mientras que en los *Eng*^{+/+} contamos 29 ± 3 . A los veintiocho días de inducir la isquemia las diferencias en la densidad capilar entre ambos tipos de animales se igualaron (Figura 5).

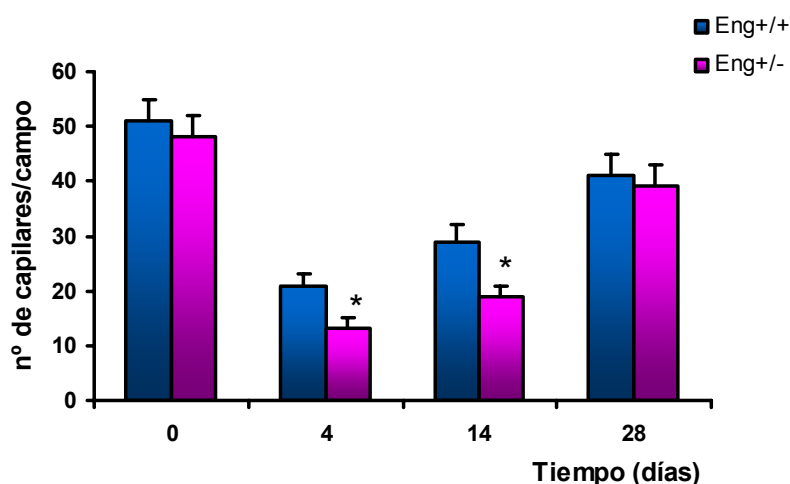


Figura 5. Evolución de la densidad capilar tras la ligadura de la arteria femoral en los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Los capilares se identificaron por tinción inmunohistoquímica positiva para PECAM y por su morfología. Los datos se expresan como la media \pm EEM (n=20 campos). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: **p*<0.05 vs animales *Eng*^{+/+} en el mismo tiempo.

Estos resultados son los primeros en demostrar el efecto de la insuficiencia de endoglina en la neovascularización de un tejido isquémico. La perfusión temprana después de la ligadura de la arteria femoral en los ratones haploinsuficientes de endoglina sufre un retraso significativo comparada con la perfusión en los ratones que presentan niveles normales de esta proteína.

Por tanto, este estudio demuestra la implicación de la endoglina en la angiogénesis en el individuo adulto, y se suma a trabajos anteriores que

ponen de manifiesto el papel de la proteína en la angiogénesis tumoral (Burrows y cols., 1995; Wang y cols., 1993; Thorpe y Burrows, 1995) y fetal (Bourdeau y cols., 1999; Li y cols., 1999; Arthur y cols., 2000). Juntas estas evidencias esclarecen la importancia de la endogлина en la neoangiogénesis, pero no se conoce el mecanismo por el cual se produce la acción proangiogénica de dicha proteína.

3. Expresión del ARNm de VEGF, COX-2 y TGF- β 1 en el músculo aductor después de la isquemia

Dadas las diferencias encontradas en la neovascularización post-isquémica entre los animales control y los haploinsuficientes en endogлина, decidimos estudiar la expresión de algunos de los principales factores angiogénicos y mediadores de la inflamación en los músculos de unos y otros animales. Estos experimentos se realizaron en los músculos aductores de los ratones al cuarto día de producir la isquemia, puesto que fue a este tiempo cuando las diferencias en la curva de reperfusión tisular eran mayores (Figura 3).

En primer lugar estudiamos la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el principal factor pro-angiogénico (Ferrara y cols., 2003).

En ausencia de isquemia los niveles de ARNm de VEGF fueron ligeramente más bajos en los ratones *Eng*^{+/-} que en los *Eng*^{+/+}. En los músculos isquémicos aumentó la expresión de ARNm de VEGF respecto a los respectivos músculos contralaterales, pero no encontramos diferencias entre los ratones *Eng*^{+/+} y los *Eng*^{+/-} (Figura 6).

Realizamos además un estudio inmunohistoquímico de VEGF en cortes de tejido muscular. La mayor inmunoexpresión de VEGF la detectamos en los músculos isquémicos de los animales *Eng*^{+/+} (Figura 7B), que superó a la encontrada en los músculos no-isquémicos (Figura 7A) y a la de los animales haploinsuficientes (Figuras 7C y 7D).

En segundo lugar estudiamos la expresión de la ciclooxigenasa (COX)-2 en los músculos de unos y otros animales, por la importancia de

esta enzima en los procesos inflamatorios (Morita, 2002). Además, la COX-2 también se ha relacionado con la angiogénesis, ya que aumenta la síntesis de prostanoïdes, y estos a su vez estimulan la síntesis de algunos factores proangiogénicos. Existe además un mecanismo de retroalimentación positivo, según el cual estos factores proangiogénicos aumentan la liberación de ácido araquidónico y la expresión de COX-2 (Íñiguez y cols., 2003).

La isquemia aumentó ligeramente la expresión de ARNm de COX-2, pero no encontramos diferencias entre los ratones control y los haploinsuficientes (Figura 6).

Por último, estudiamos la expresión del factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1. Esta citoquina participa tanto en la fase inicial como en la fase de resolución de la angiogénesis (van den Driesche y cols., 2003). Además, el estudio de TGF- β 1 tiene especial importancia para nosotros porque la endoglina forma parte de su complejo de receptores (Letamendía y cols., 1998 a; Barbara y cols., 1999) y está demostrado que la endoglina modula algunas de las respuestas biológicas de este factor de crecimiento (Li y cols., 2000; Lastres y cols., 1996; Letamendía y cols., 1998 b; Goumans y cols., 2002; Lebrin y cols., 2004; Díez-Marques y cols., 2004).

La isquemia incrementó significativamente el ARNm de TGF- β 1 tanto en los animales *Eng*^{+/+} como en los *Eng*^{+/-}. Sin embargo no hallamos diferencias en la expresión del ARNm de TGF- β 1 entre los dos tipos de animales (Figura 6).

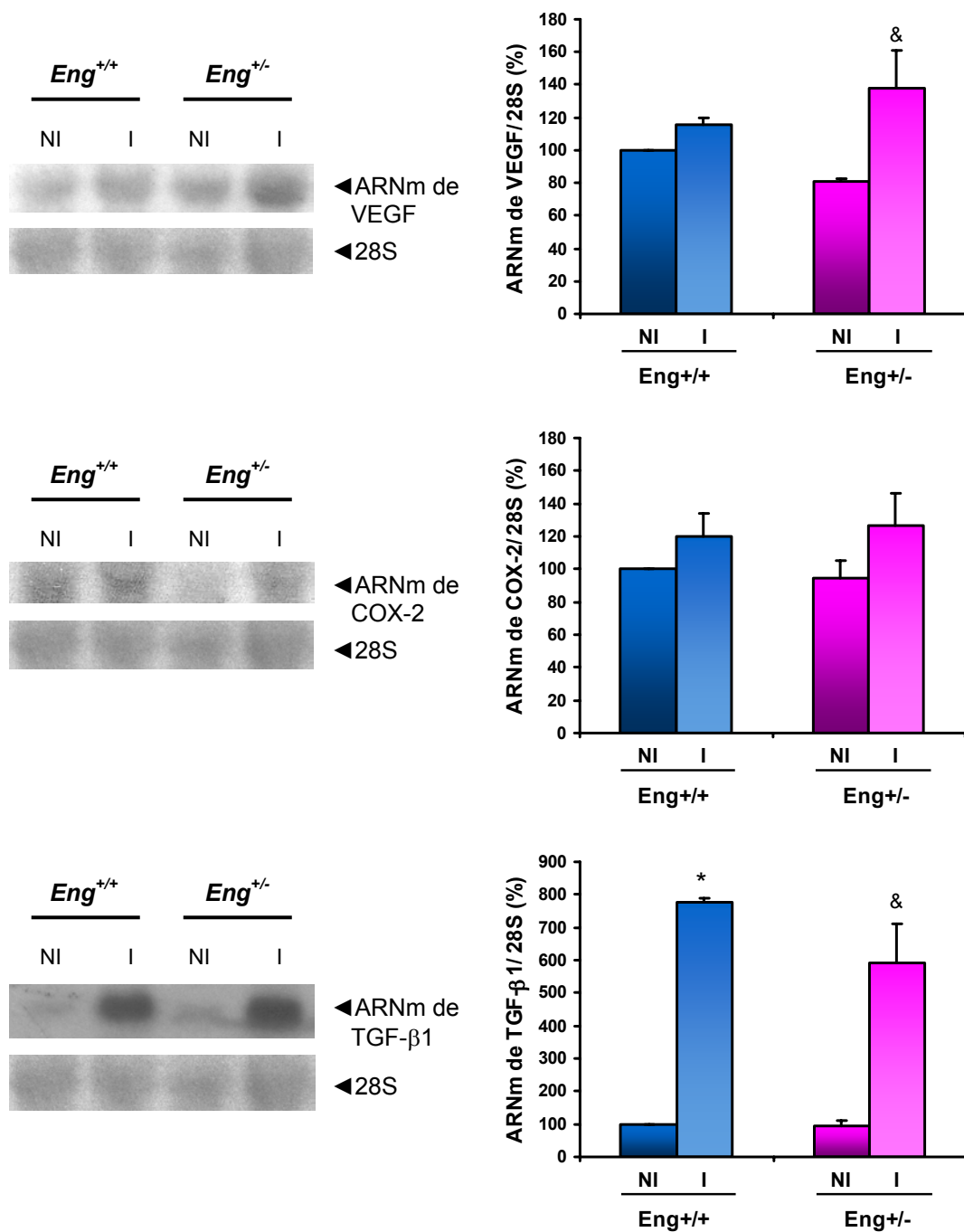


Figura 6. Expresión de ARNm de VEGF, COX-2 y TGF-β1 en los músculos aductores de ratones *Eng^{+/+}* y *Eng^{+/-}* después de cuatro días de la ligadura de la arteria femoral. La determinación se realizó mediante Northern blot. Se usó como control interno de carga la subunidad ribosomal 28S. Los datos, obtenidos en tres experimentos diferentes, se expresan como la media ± EEM (n=6 animales). Diferencias estadísticas significativas según el test de Scheffe: *p<0.05 vs músculos no-isquémicos de ratones *Eng^{+/+}*; &p<0.05 vs músculos no-isquémicos de ratones *Eng^{+/-}*. NI: músculos no-isquémicos. I: músculos isquémicos.

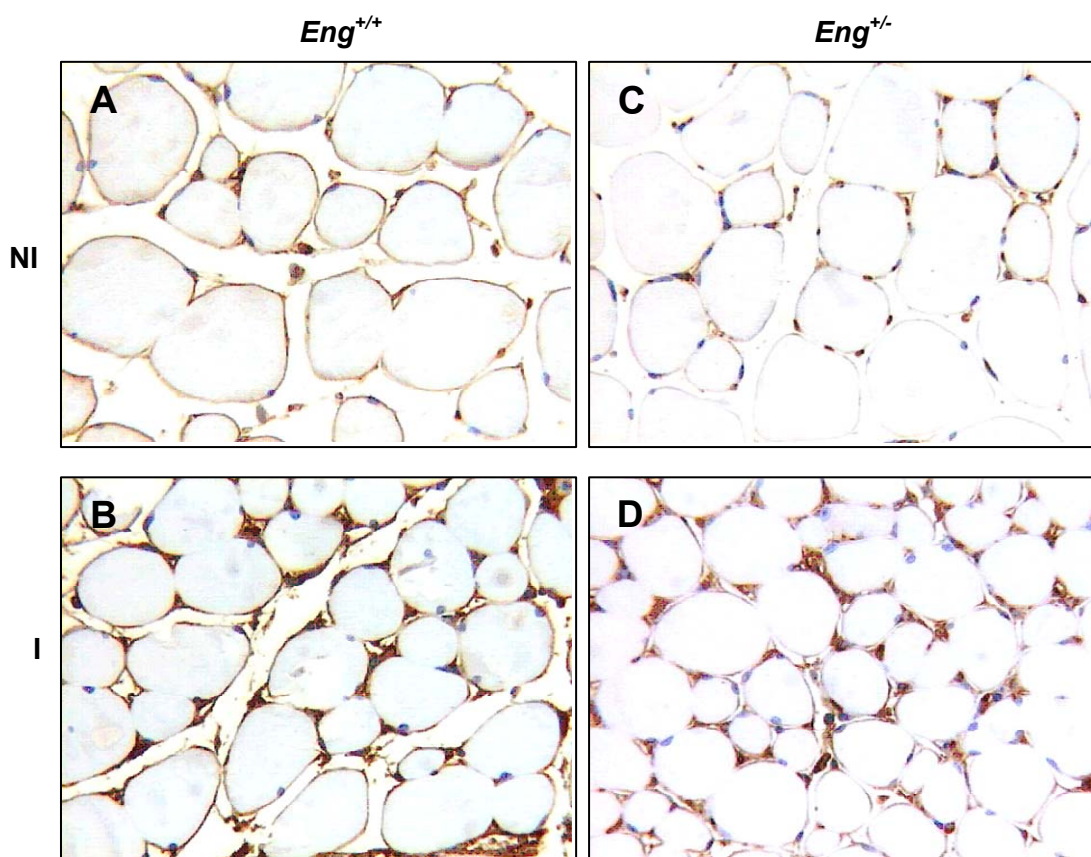


Figura 7. Expresión de VEGF en los músculos aductores de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} después de cuatro días de la ligadura de la arteria femoral. La determinación se realizó mediante inmunohistoquímica utilizando un AcM de ratón anti- VEGF humano, Clon C-1. Imágenes tomadas al microscopio óptico (x 20 aumentos). NI: músculos no-isquémicos. I: músculos isquémicos.

Nuestros resultados demuestran que el aumento en la expresión de estos factores en el periodo de reperusión se produce tanto en los animales control como en los haploinsuficientes, no observándose diferencias entre los dos grupos de animales. Por tanto, la menor angiogénesis post-isquémica que encontramos en los ratones *Eng*^{+/-} comparada con la de los ratones *Eng*^{+/+}, no parece estar basada en una disminución en la expresión de los factores de crecimiento angiogénico, como son VEGF, COX-2 y TGF- β 1.

4. Expresión del ARNm de endoglina en el músculo después de la isquemia

Una vez demostrada la ausencia de diferencias notables en la expresión de los principales factores angiogénicos, decidimos estudiar qué ocurría con la expresión de endoglina tras la isquemia en unos y otros animales. Los estudios los realizamos igualmente en los músculos aductores extraídos al cuarto día de producir la isquemia, puesto que fue a este tiempo cuando las diferencias en la curva de reperfusión tisular fueron mayores (Figura 3).

Los niveles de ARNm de endoglina en los músculos fueron significativamente menores en los animales *Eng*^{+/-} que en los *Eng*^{+/+}, tanto en los músculos isquémicos como en los no-isquémicos. Tras la isquemia, la expresión del ARNm de endoglina se incrementó en ambos grupos de animales, manteniéndose las diferencias entre los ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} (Figura 8).

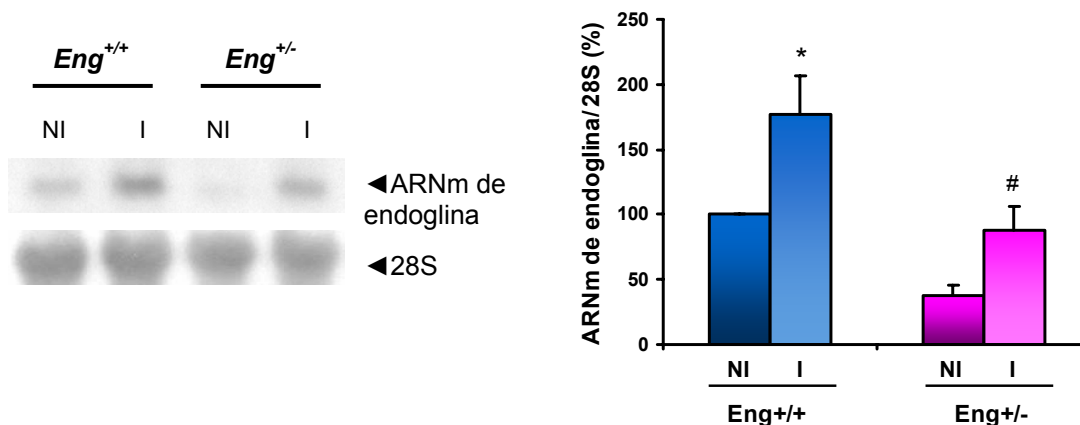


Figura 8. Expresión de ARNm de endoglina en los músculos aductores de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} después de cuatro días de la ligadura de la arteria femoral. La determinación se realizó mediante Northern blot. Se usó como control interno de carga la subunidad ribosomal 28S. Los datos, obtenidos en tres experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=6 animales). Diferencias estadísticas significativas según el test de Scheffe: *p<0.05 vs músculos no-isquémicos de ratones *Eng*^{+/+}; #p<0.05 vs músculos isquémicos de ratones *Eng*^{+/+}. NI: músculos no-isquémicos. I: músculos isquémicos.

Realizamos además un estudio inmunohistoquímico de endoglina en cortes de tejido muscular. Observamos una expresión muy tenue en los capilares de los músculos isquémicos de los ratones *Eng*^{+/-} (Figura 9D), mientras que prácticamente no conseguimos detectar la expresión en el músculo contralateral no-isquémico (Figura 9C). Por el contrario, la endoglina fue claramente detectada en los músculos isquémicos de animales *Eng*^{+/+} (Figura 9B), siendo esta expresión notablemente mayor a la encontrada en los músculos no isquémicos de los mismos animales (Figura 9A).

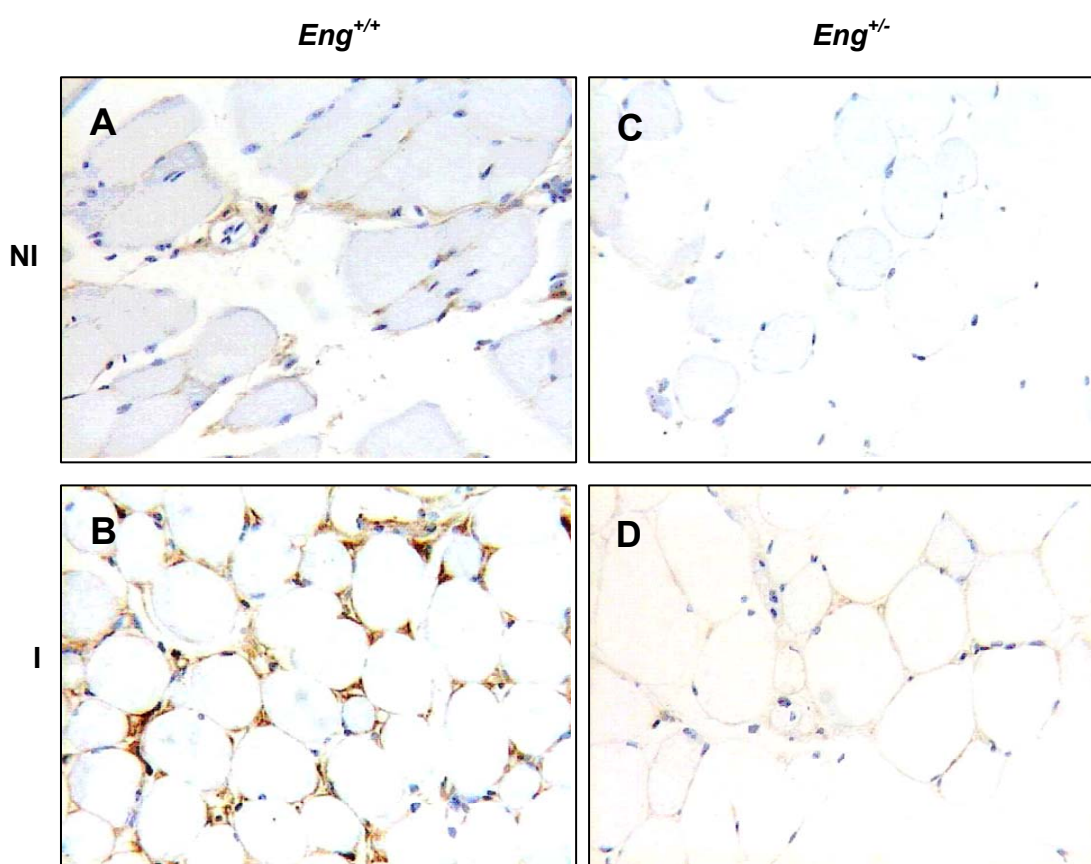


Figura 9. Expresión de endoglina en los músculos aductores de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} después de cuatro días de la ligadura de la arteria femoral. La determinación se realizó mediante inmunohistoquímica utilizando un AcM de ratón anti-endoglina humana, Clon SN6h. Imágenes tomadas al microscopio óptico (x 20 aumentos).

Por tanto, los estudios inmunohistoquímicos confirman los resultados obtenidos a nivel de ARNm. En el retraso en la angiogénesis que

presentan los animales haploinsuficientes, parece clave la diferencia en la expresión de endoglina entre ambos tipos de animales $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$, lo que demuestra la importancia que tiene la expresión de endoglina para que la angiogénesis se desarrolle con normalidad en el individuo adulto.

El aumento en la expresión de endoglina en tejidos en los que se está produciendo angiogénesis ya ha sido descrito por otros autores (Krupinski y cols., 1994; Rulo y cols., 1995; Torsney y cols., 2002). También se ha demostrado una atenuación de la angiogénesis *in vitro* cuando se inhibe la expresión de endoglina (Li y cols., 2000). Nosotros observamos un aumento en la expresión de endoglina tanto en los músculos isquémicos de los animales $Eng^{+/+}$ como en los de los $Eng^{+/-}$. Sin embargo el aumento que se produce en los $Eng^{+/-}$ no parece ser suficiente para que la angiogénesis se desarrolle normalmente en estos animales.

5. Expresión de NOS en tejidos de ratones $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$

Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que la haploinsuficiencia de endoglina se asocia a una deficiente vasodilatación dependiente del endotelio, causada por la expresión reducida de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la síntesis deficiente de óxido nítrico (NO) que presentan los animales haploinsuficientes (Jerkic y cols., 2004). Además, el NO desempeña un papel muy importante en el inicio del proceso angiogénico, pues produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Esto permite que los factores proangiogénicos difundan y se unan a receptores específicos de las células endoteliales (Ziche y cols., 1994; Ziche y cols., 1997). Por estos motivos pensamos que la deficiencia en la expresión de eNOS que presentan los animales $Eng^{+/-}$ podría ser la causa de la menor angiogénesis que encontramos en estos animales respecto a los control.

Para analizar esta posibilidad, estudiamos la expresión de NOS en los animales $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$. Valoramos en primer lugar la expresión de eNOS, la forma constitutiva endotelial de la enzima, en los pulmones de los dos

tipos de ratones. Los niveles de la eNOS en los ratones *Eng*^{+/-} fueron aproximadamente la mitad a los encontrados en los ratones *Eng*^{+/+} (Figura 10). Los niveles de la forma fosforilada de la proteína (p-eNOS) también fueron menores en los pulmones de animales *Eng*^{+/-} que en los de los *Eng*^{+/+} (Figura 10).

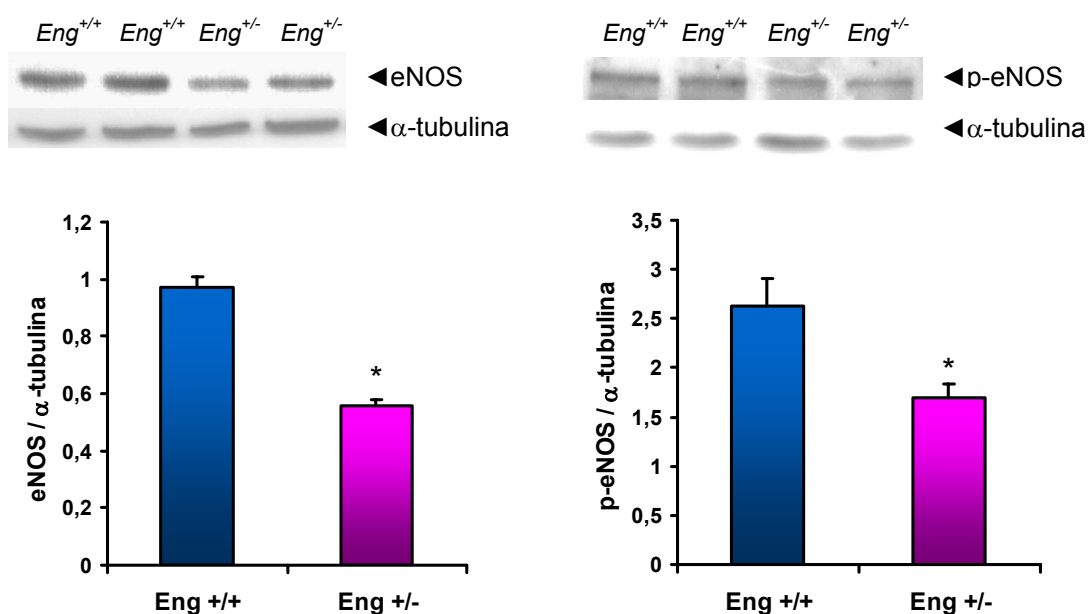


Figura 10. Expresión de eNOS y p-eNOS en pulmones de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando un AcP de conejo anti-eNOS y un AcP de cabra anti-p-eNOS. Se usó como control interno de carga la expresión de α-tubulina. Los datos se expresan como la media ± EEM (n=6 animales). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: *p<0.05 vs ratones *Eng*^{+/+}.

Estos resultados demuestran la relación existente entre la expresión de endoglina y eNOS. Además del pulmón, esta relación también se ha demostrado en otros tejidos de animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}, como son el riñón y la arteria carótida (Jerkic y cols., 2004).

6. Expresión de eNOS en el músculo después de la isquemia

El siguiente paso fue analizar la expresión de eNOS después de producir la isquemia. Al igual que en los casos anteriores, realizamos el

estudio en los músculos aductores recogidos al cuarto día de ligar la arteria femoral.

En los músculos no-isquémicos (músculos control), encontramos que la expresión de ARNm de eNOS era menor en los ratones *Eng*^{+/-} que en los de los ratones *Eng*^{+/+} (Figura 11). Este resultado confirma la relación que existe entre la expresión de endoglin y la expresión de eNOS, y que ya habíamos encontrado en el pulmón (Figura 10).

Tras la isquemia, la expresión de ARNm de eNOS se incrementó tanto en los músculos de animales *Eng*^{+/-} como en los de los animales *Eng*^{+/+}. Sin embargo, se mantenía la expresión de eNOS reducida en los músculos *Eng*^{+/-} respecto a los *Eng*^{+/+} (Figura 11).

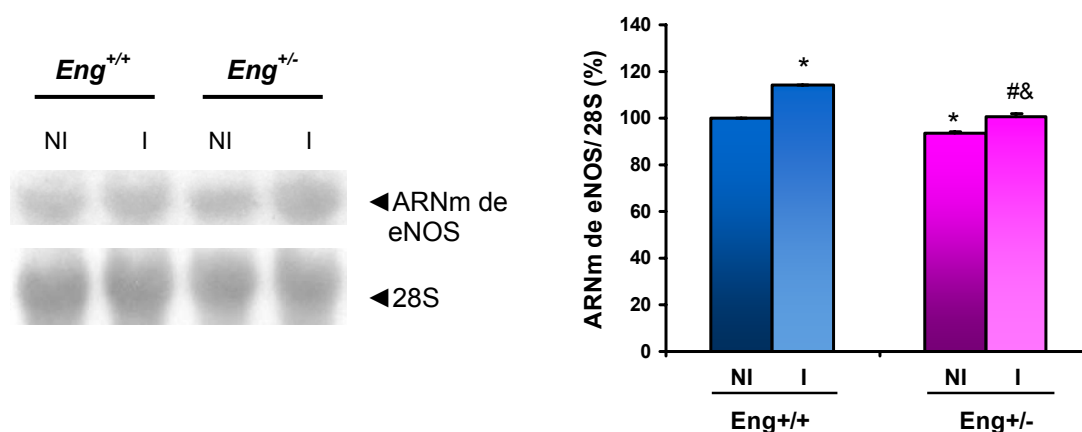


Figura 11. Expresión de ARNm de eNOS en los músculos aductores de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} después de cuatro días de la ligadura de la arteria femoral. La determinación se realizó mediante Northern blot. Se usó como control interno de carga la subunidad ribosomal 28S. Los datos, obtenidos en tres experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=6 animales). Diferencias estadísticas significativas según el test de Scheffe: *p<0.05 vs músculos no-isquémicos de ratones *Eng*^{+/+}; #p<0.05 vs músculos isquémicos de ratones *Eng*^{+/+}; &p<0.05 vs músculos no isquémicos de ratones *Eng*^{+/-}. NI: músculos no-isquémicos. I: músculos isquémicos.

Para confirmar si las diferencias a nivel de ARNm se traducían en diferencias en la proteína, estudiamos la expresión de eNOS en los músculos isquémicos y no-isquémicos mediante Western blot.

Los músculos no-isquémicos de los animales haploinsuficientes expresaban menos eNOS que los controles. En los músculos isquémicos la

expresión de eNOS aumentó en los dos tipos de animales respecto a los músculos no isquémicos, pero el contenido en eNOS seguía siendo menor en los ratones *Eng*^{+/-} que en sus controles *Eng*^{+/+} (Figura 12). Por tanto, demostramos que a nivel proteico se mantienen las diferencias encontradas a nivel de ARNm.

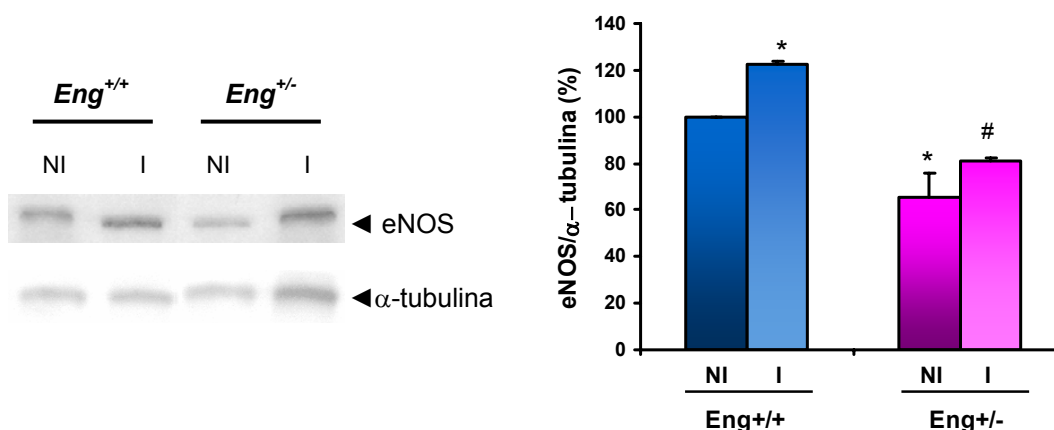


Figura 12. Expresión de eNOS en los músculos aductores de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} después de cuatro días de la ligadura de la arteria femoral. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando un AcP de ratón anti-eNOS. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. Los datos, obtenidos en tres experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=6 animales). Diferencias estadísticas significativas según el test de Scheffe: *p<0.05 vs músculos no-isquémicos de ratones *Eng*^{+/+}; #p<0.05 vs músculos isquémicos de ratones *Eng*^{+/+}. NI: músculos no-isquémicos. I: músculos isquémicos.

7. Angiogénesis post-isquémica en ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} tratados con L-NAME

Debido a la asociación existente entre la haploinsuficiencia de endogлина y la deficiencia en eNOS (Jerkic y cols., 2004), a las diferencias encontradas en eNOS a nivel de ARNm y proteína en los músculos isquémicos de los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}, y a la implicación del NO en la regulación de la angiogénesis (Ziche y cols., 1994; Ziche y cols.,1997), decidimos tratar los animales con N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor no selectivo de la NOS, durante el periodo de reperfusión posterior a la ligadura de la arteria femoral. De esta manera evaluamos el efecto de la inhibición de la producción de NO en la perfusión post-isquémica en los dos tipos de animales.

El L-NAME es un análogo de la L-arginina que se comporta como un antagonista competitivo de la NOS, la enzima que cataliza la reacción de síntesis de NO (Marletta, 1994). Según algunos autores, el L-NAME no inhibe completamente la producción de NO (Cohen y cols., 1997); según otros la inhibición que provoca es total (Nagao y cols., 1992).

Comprobamos la efectividad en la inhibición de la síntesis de NO en nuestro modelo mediante el tratamiento con L-NAME. Para ello realizamos una determinación de nitritos en el plasma de los animales a los veintiocho días de practicar la ligadura de la arteria femoral.

Los iones nitrito son productos aniónicos estables que se forman a partir de NO (Marletta, 1988; Anggard 1994). Por este motivo, en ausencia de contaminación bacteriana, la producción de nitritos se interpreta como una medida directa de la producción de NO.

El decremento en la concentración de nitritos en el plasma de los animales tratados con respecto a los no tratados demuestra claramente la efectividad del tratamiento con L-NAME. Además, este experimento corrobora la diferencia en la expresión de eNOS que existe entre los animales *Eng^{+/+}* y *Eng^{+/-}*, como lo demuestra la diferencia en la concentración de nitritos en el plasma de los animales *Eng^{+/+}* y *Eng^{+/-}* sin tratar. Es importante señalar que la producción de NO después del tratamiento con L-NAME fue similar en unos y otros animales (Figura 13).

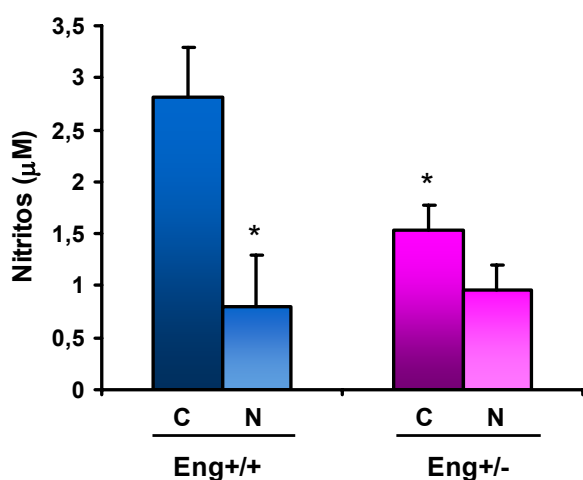


Figura 13. Concentración de nitritos en el plasma de animales *Eng^{+/+}* y *Eng^{+/-}* tratados con L-NAME en el agua de bebida (10 mg/Kg/día). Se determinó la concentración de nitritos en las muestras de plasma obtenidas a los veintiocho días de practicar la ligadura de la arteria, según una modificación del método de Griess. Los datos, se expresan como la media \pm EEM (n=6 animales). Diferencias estadísticas significativas según el test de Scheffe: * $p < 0.05$ vs ratones control *Eng^{+/+}*. C: animales control (sin tratar). N: animales tratados con L-NAME.

La inhibición de la síntesis de NO, produjo una reducción en la recuperación de la perfusión tisular de los ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}, aunque en estos últimos en menor medida. La velocidad de reperfusión tisular en los animales tratados con L-NAME fue igual en los animales *Eng*^{+/+} y en los *Eng*^{+/-}, por lo que las curvas de reperfusión se solapan (Figuras 14 y 15). Así, nuestro estudio demuestra claramente que la inhibición de la síntesis de NO reduce la neovascularización post-isquémica en los ratones *Eng*^{+/+}, mientras que el efecto es mucho menor en los *Eng*^{+/-}. Estos datos sugieren que, como ocurre con la vasodilatación dependiente del endotelio (Jerkic y cols., 2004), el retraso en la angiogénesis encontrado en los animales *Eng*^{+/-} podría deberse a una reducción en la síntesis de NO, causada por la baja expresión de eNOS en estos animales.

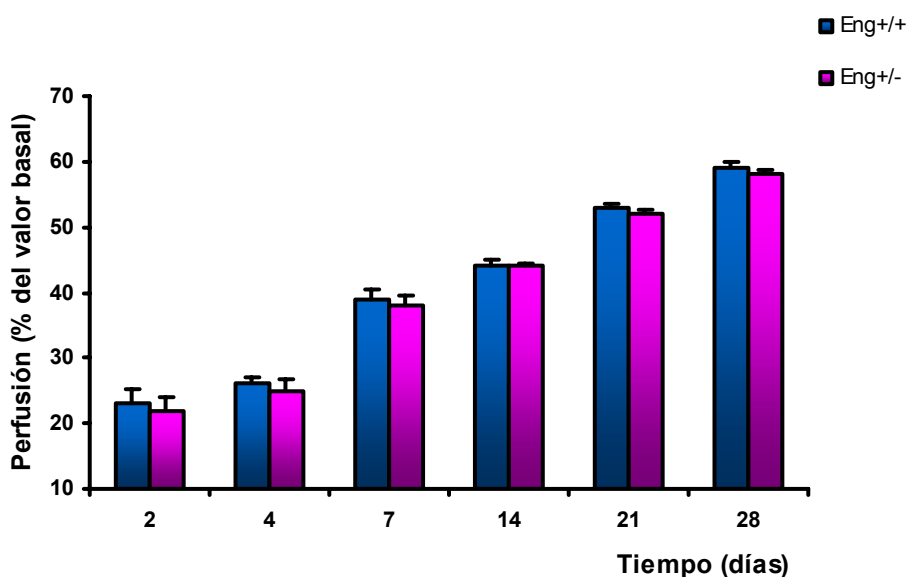


Figura 14. Evolución de la reperfusión tisular tras la ligadura de la arteria femoral en los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} tratados con L-NAME en el agua de bebida (10mg/Kg/día). La perfusión se midió con un sistema de flujometría por laser Doppler. La perfusión en la pata isquémica se calculó como porcentaje de la perfusión en la pata no isquémica (valor basal). Los datos se expresan como la media ± EEM (n=6 animales).

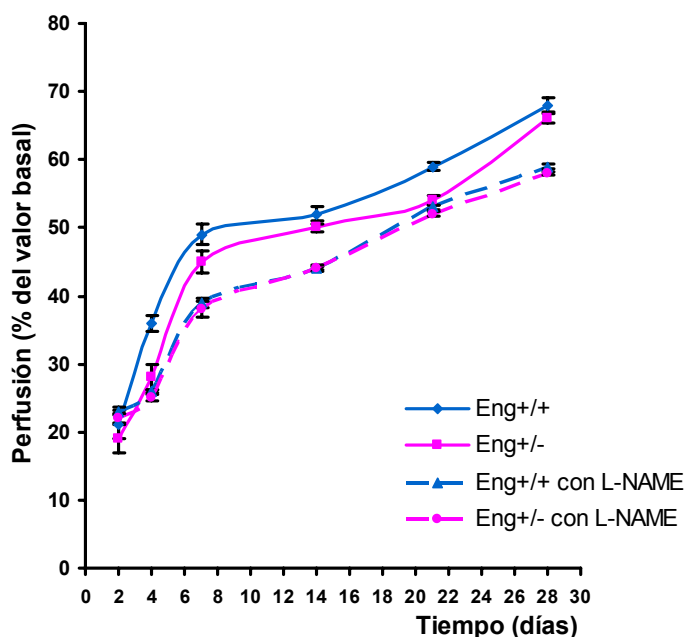


Figura 15. Curvas de reperfusión tisular tras la ligadura de la arteria femoral en los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} tratados y no tratados con L-NAME en el agua de bebida (10mg/Kg/día).

La perfusión en la pata isquémica se calculó como porcentaje de la perfusión en la pata no isquémica (valor basal). Los datos se expresan como la media \pm EEM (n=10 animales no tratados; n=6 animales tratados). Diferencias estadísticas significativas según el test de Bonferroni: curva *Eng*^{+/-} vs curva *Eng*^{+/+}, curva *Eng*^{+/+} con L-NAME vs curva *Eng*^{+/+}; curva *Eng*^{+/-} con L-NAME vs curva *Eng*^{+/-}, p<0.01.

Recientemente, algunos investigadores han demostrado la implicación del NO en la regulación de la angiogénesis. Noiri y cols. (1998) afirman que el NO induce un cambio en el fenotipo de las células endoteliales, desde el estado estacionario hasta un estado de locomoción, que les permite migrar direccionalmente. Por otra parte, se ha establecido que el NO media los efectos mitogénicos de VEGF en las células endoteliales (Morbidelli y cols., 1996; Ziche y cols., 1997) y que este factor de crecimiento regula positivamente la producción de NO endotelial y la proteína eNOS (Papapetropoulos y cols., 1997; Hood y cols., 1998). Los donadores de NO, como el nitroprusiato, promueven la proliferación y migración de las células endoteliales, mientras que los inhibidores de eNOS inhiben estas respuestas trascendentales en el proceso angiogénico (Ziche y cols., 1994). Además, Murohara y cols. (1998) han sugerido que la eNOS modula la angiogénesis en respuesta a isquemia tisular, demostrando un retraso en la angiogénesis en las patas isquémicas de ratones a los que les falta el gen de eNOS. Tanto la proliferación, como la migración y la diferenciación de células endoteliales, determinadas con un ensayo de crecimiento de pseudocapilares a partir de anillos de vasos, resultaron

disminuidas en los anillos obtenidos de animales deficientes en eNOS (Lee y cols., 1999). Por último, se sabe que el NO actúa como un factor de supervivencia de las células endoteliales y puede ser necesario para prevenir la apoptosis durante las fases iniciales de la angiogénesis (Tzeng y cols., 1997; Dimmeler y cols., 1997).

8. Angiogénesis *in vitro* a partir de anillos de aorta de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}

Una vez demostrada la implicación de la endogлина en la angiogénesis con un modelo de neovascularización fisiológica *in vivo*, decidimos estudiar el proceso con un modelo *in vitro* que nos permitiera simplificar las condiciones que se dan en el organismo y profundizar en los mecanismos por los cuales la endogлина participa en el proceso. Utilizamos un modelo que consiste en cuantificar el crecimiento de pseudocapilares en *Matrigel* a partir de anillos de aorta extraídos de los animales.

Realizamos los experimentos bajo tres condiciones distintas: en el primer estudio cultivamos los anillos de aorta embebidos en *Matrigel* con medio de cultivo DMEM/HAMF12 1:1 que contenía un 20% de SBF. A los tres o cuatro días, algunas células comenzaron a migrar desde el borde de la aorta hacia el *Matrigel* (Figura 16A). Sucesivamente estas primeras células migraron y proliferaron hasta formar estructuras organizadas en forma de tubo (pseudocapilares) (Figuras 16B, 16C y 16D), que se ramificaban y crecían ocupando el *Matrigel* de forma tridimensional. Analizamos mediante microscopía de contraste de fases la aparición de las primeras células, así como la morfología y la superficie ocupada por los pseudocapilares (Figura 17A), no encontrando diferencias entre los pseudocapilares *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}.

En el segundo estudio las condiciones de cultivo fueron similares, pero añadiendo al medio de cultivo un suplemento para el crecimiento de células endoteliales (ECGS) y al *Matrigel* los factores de crecimiento EGF y PDGF. En este caso, las células comenzaron a migrar desde la aorta a los tres o cuatro días, igual que en el experimento anterior, pero el crecimiento

de los pseudocapilares fue muy superior. No obstante, tampoco encontramos diferencias ni en la morfología ni en el crecimiento entre los pseudocapilares *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} con estas condiciones de cultivo (Figura 17B).

En un tercer estudio, además de ECGS, EGF y PDGF añadimos TGF- β 1 al *Matrigel*. En estas condiciones, obtuvimos curvas de crecimiento de pseudocapilares diferentes entre los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}: la presencia de TGF- β 1 en el *Matrigel* hizo que los pseudocapilares provenientes de los ratones *Eng*^{+/-} proliferaran ligeramente más rápido que los provenientes de los ratones *Eng*^{+/+}. No obstante las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 17C).

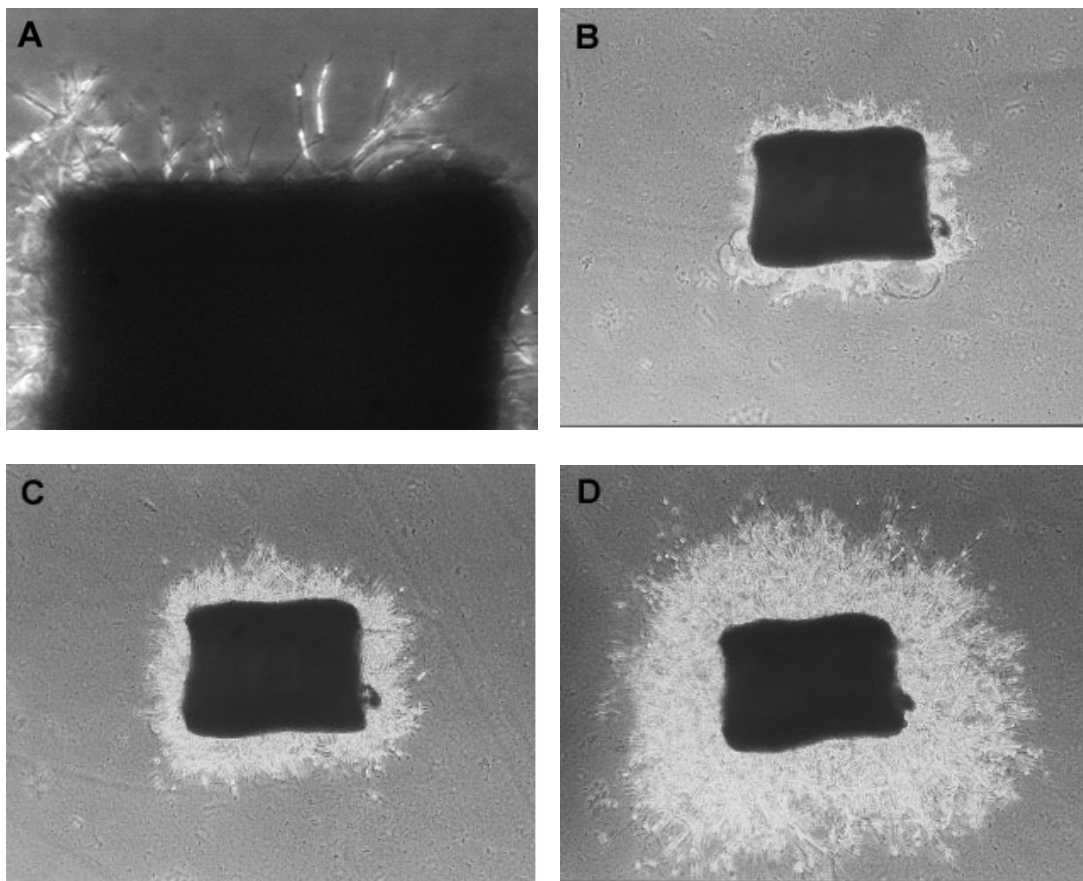


Figura 16. Cultivo de un anillo de aorta en *Matrigel*. Condiciones de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 20%. Imágenes tomadas al microscopio óptico de contraste de fases (x 100 (A) o x 40 (B, C, D) aumentos). **A.** Tres días tras el cultivo de la aorta. **B.** Cuatro días tras el cultivo de la aorta. **C.** Séis días tras el cultivo de la aorta. **D.** Ocho días tras el cultivo de la aorta.

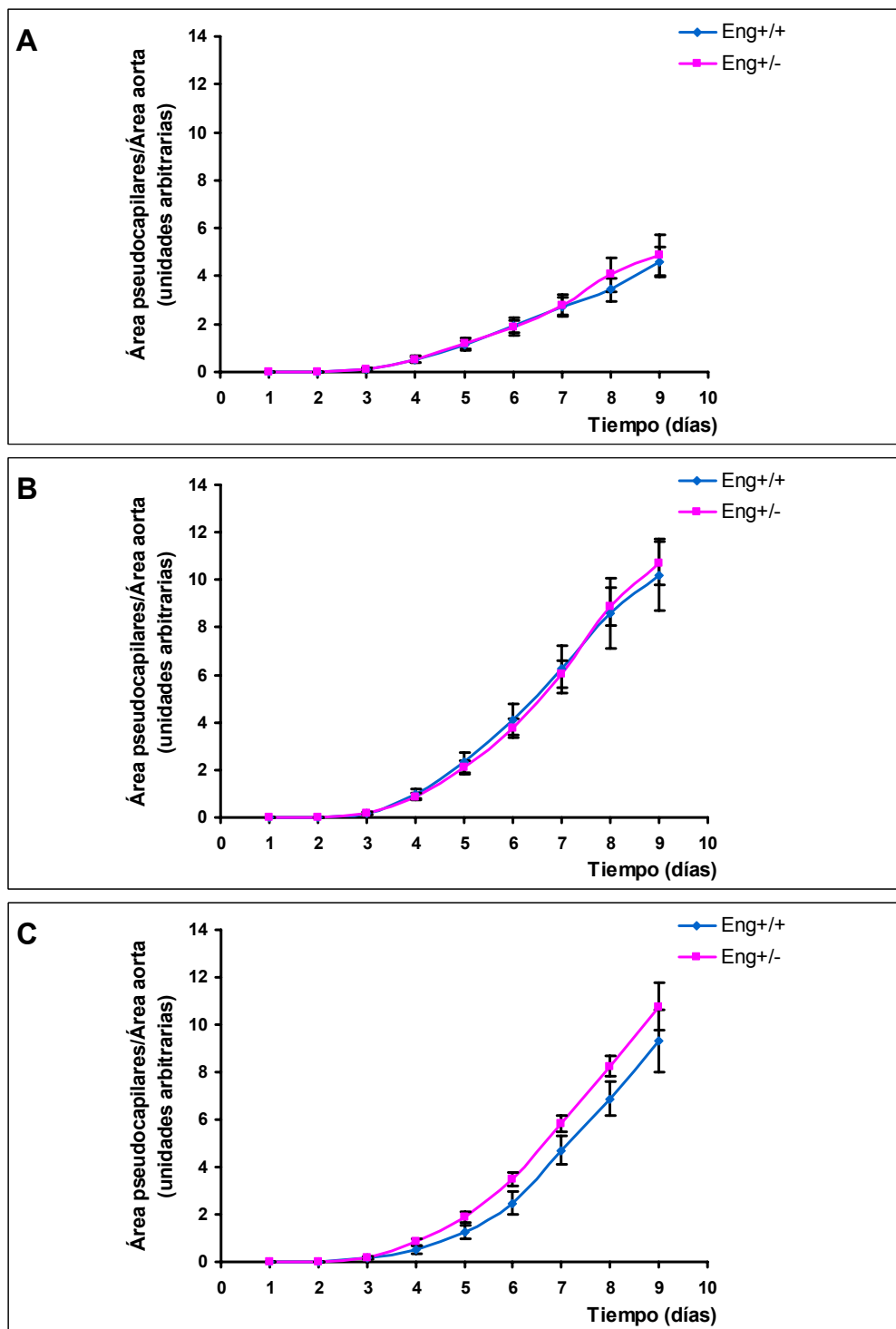


Figura 17. Evolución del crecimiento de pseudocapilares en *Matrigel* a partir de anillos de aorta. Los datos se expresan como la media \pm EEM. **A.** Condiciones de cultivo: medio DMEM/HAMF12 1:1, SBF 20%. Los anillos de aorta provenían de ratones *Eng*^{+/+} (n=3 animales, 11 anillos) y *Eng*^{+/-} (n=3 animales, 10 anillos). **B.** Condiciones de cultivo: igual a “A”, añadiendo al medio ECGS (100 μ g/mL) y al *Matrigel* EGF (0.7 ng/mL) y PDGF (12 pg/mL). Los anillos de aorta provenían de ratones *Eng*^{+/+} (n=5 animales, 12 anillos) y *Eng*^{+/-} (n=5 animales, 12 anillos). **C.** Condiciones de cultivo: igual a “B”, añadiendo al *Matrigel* TGF- β 1 (0.6 ng/mL). Los anillos de aorta provenían de ratones *Eng*^{+/+} (n=2 animales, 6 anillos) y *Eng*^{+/-} (n=2 animales, 6 anillos).

Con estos experimentos no encontramos diferencias en la formación de pseudocapilares a partir de las aortas de los ratones *Eng^{+/+}* y *Eng^{+/-}*. Probablemente las condiciones de crecimiento con las que trabajamos no eran las adecuadas para hallar dichas diferencias en la angiogénesis. Las condiciones del modelo *in vivo* de reperfusión post-isquémica son mucho más complejas en cuanto a celularidad, producción de citoquinas y otros factores, conexión del endotelio con otros órganos y tejidos... Ésta podría ser la causa por la cual en este modelo *in vitro* no encontramos diferencias en la angiogénesis mientras que en el modelo *in vivo* observamos claramente un retraso en la angiogénesis de los ratones *Eng^{+/-}*.

9. Cultivo y caracterización de células endoteliales de aorta de ratón *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}

Las células endoteliales participan de manera fundamental en los procesos de remodelado vascular y angiogénesis (Sumpio y cols., 2002). Por otro lado, la endogлина se expresa fundamentalmente en células endoteliales (Gougos y Letarte, 1988 a) y tiene un papel crítico en la función endotelial, puesto que la eliminación del gen de la endogлина en ratones desencadena defectos en el desarrollo cardiovascular y el remodelado vascular (Li y cols., 1999; Bourdeau y cols., 2000 a; Arthur y cols., 2000). Las mutaciones en el gen de la endogлина humana son responsables de la HHT-1 (McAllister y cols., 1994; Shovlin y Letarte, 1999), y la haploinsuficiencia de endogлина parece ser el mecanismo patogénico de esta enfermedad vascular (Pece-Barbara y cols., 1999). Por todos estos motivos, nos propusimos generar cultivos de células endoteliales a partir de los ratones *Eng*^{+/-} y sus controles *Eng*^{+/+}, con el fin de estudiar el papel que el gen de la endogлина desempeña en la biología endotelial.

Obtuvimos cultivos primarios de células endoteliales a partir del aislamiento de los pseudocapilares que crecían de los anillos de aorta en el *Matrigel* (Figura 16). Recogimos los pseudocapilares del *Matrigel* al noveno día del cultivo de la aorta, debido a que después de este tiempo comienzan a remitir. Este hecho probablemente se deba a la falta de ciertos factores necesarios para el desarrollo y la maduración de los capilares sanguíneos. Para el aislamiento de los pseudocapilares utilizamos una solución no enzimática para que las células fueran dañadas lo menos posible. Una vez aislados, se dejaron en placas de cultivo para permitir la adhesión y crecimiento de las células endoteliales (Figura 18).

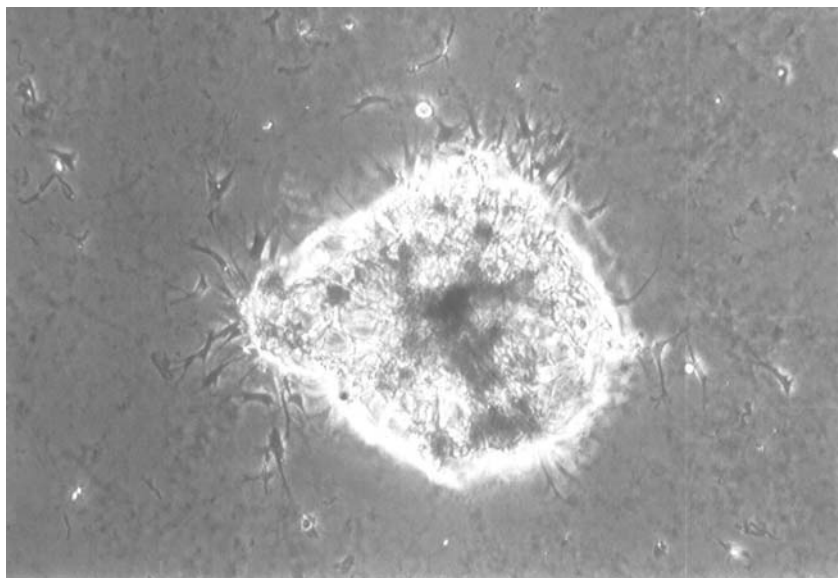


Figura 18. Pseudocapilares aislados del *Matrigel* y sembrados en una placa petri. Podemos observar como algunas células provenientes de los pseudocapilares se adhieren a la placa. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 20%. Imagen tomada al microscopio óptico de contraste de fases (x 20 aumentos).

Cada cultivo primario de células endoteliales de aorta de ratón (CEAR) procedente de animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} fue caracterizado en los pases 3, 6 y 9 mediante criterios morfológicos e inmunológicos. De esta manera evitamos posibles contaminaciones con otros tipos celulares presentes en la aorta (fibroblastos y células de músculo liso vascular), y nos aseguramos de que la expresión de marcadores de células endoteliales no se perdía como consecuencia de la sucesión de pases.

9.1. Morfología

Las CEAR aisladas formaban monocapas confluentes con apariencia de adoquinado características de las células endoteliales en cultivo. Además, encontramos diferencias en la monocapa formada por las células provenientes de animales *Eng*^{+/+} y las provenientes de animales *Eng*^{+/-}. Mientras las CEAR *Eng*^{+/-} tenían una forma alargada, las *Eng*^{+/+} tenían una forma mucho más redondeada, típica de las células endoteliales. En general, las CEAR *Eng*^{+/-} presentaban una apariencia menos regular que las *Eng*^{+/+} (Figura 19).

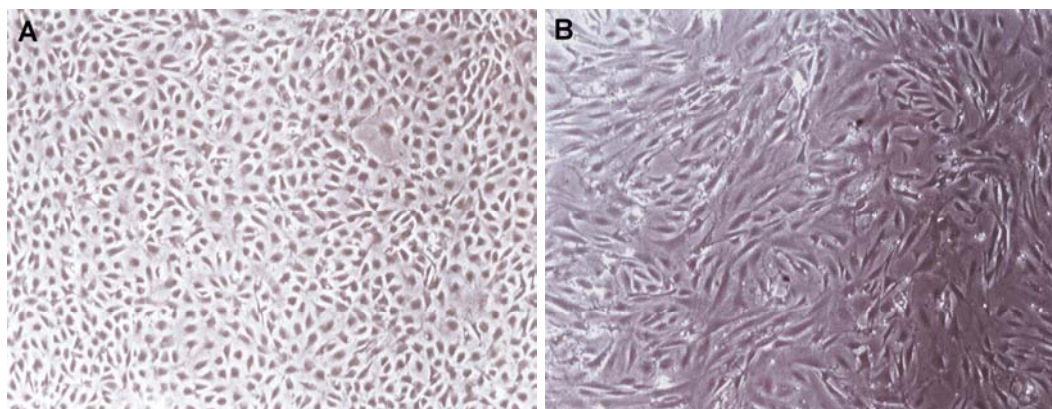


Figura 19. Monocapas confluentes de CEAR *Eng*^{+/+} (A) y *Eng*^{+/-} (B). Medio de cultivo: DMEM-HAMF12 1:1, SBF 10%. Imágenes tomadas al microscopio óptico de contraste de fases (x 40 aumentos).

Por otra parte, comprobamos la capacidad de las CEAR para formar estructuras organizadas en sustratos tridimensionales. La capacidad de formación de estas estructuras es un proceso que se usa normalmente para distinguir células endoteliales de otras células contaminantes comunes (Dong y cols., 1997). Además, el número y complejidad de las estructuras similares a capilares ha sido relacionado con la capacidad angiogénica de las células endoteliales en cultivo. Tanto las CEAR *Eng*^{+/+} como las *Eng*^{+/-} formaron rápidamente estructuras similares a capilares en *Matrigel*, pero eran mucho más claras y definidas en el caso de las CEAR *Eng*^{+/+} (Figura 20). Nuestros resultados concuerdan con otros previos que demuestran que la formación de tubos es inhibida en células endoteliales humanas procedentes de la vena umbilical (HUVEC) deficientes de endogлина (Li y cols., 2000).

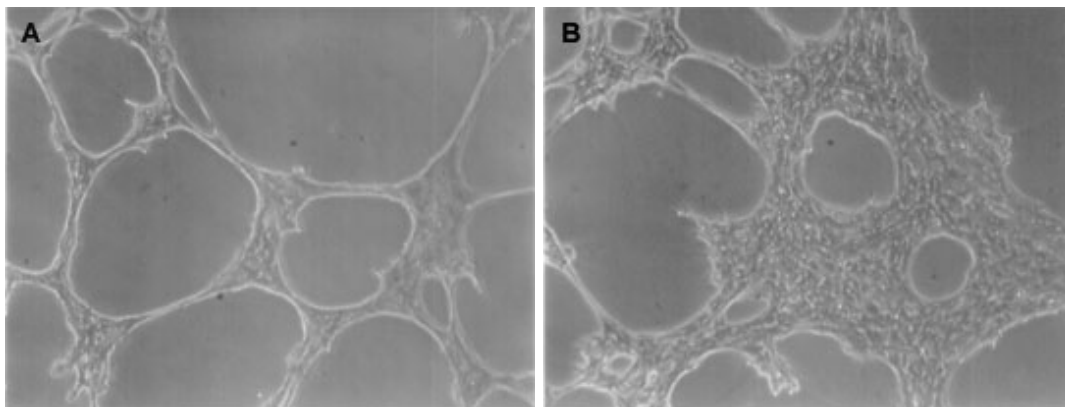


Figura 20. Estructuras formadas por las CEAR *Eng*^{+/+} (A) y *Eng*^{+/-} (B) en *Matrigel*. Medio de cultivo: DMEM-HAMF12 1:1, SBF 20%, ECGS 100 µg/mL. Imágenes tomadas al microscopio óptico de contraste de fases a las seis horas de sembrar las células (x 20 aumentos).

9.2. Marcadores celulares

Mediante técnicas de inmunofluorescencia y/o Western blot, localizamos en las CEAR diferentes marcadores celulares característicos de células endoteliales (Garlanda y Dejana, 1997): factor von Willebrand (Factor VIII) (Figuras 21 y 25A), PECAM-1 (Figuras 22 y 25B), VCAM (Figura 25C) y endogлина (Figuras 26 y 27).

También detectamos la expresión de eNOS (Figura 28), VEGF (Figura 25D) y actina (Figuras 23 y 25E). Observamos como esta última forma fibras de estrés perfectamente organizadas que componen el citoesqueleto celular (Figura 23). Estas proteínas no son específicas del endotelio, pero su detección junto con otros marcadores celulares se utiliza en la caracterización de células endoteliales.

Para asegurarnos de que los cultivos de CEAR no estaban contaminados con células de músculo liso vascular, analizamos mediante inmunofluorescencia la expresión de un marcador característico de este tipo celular: actina de músculo liso vascular. Las CEAR eran negativas para este marcador. Usamos como control positivo un lisado de células de músculo liso vascular de un cultivo primario de rata (Figura 24).

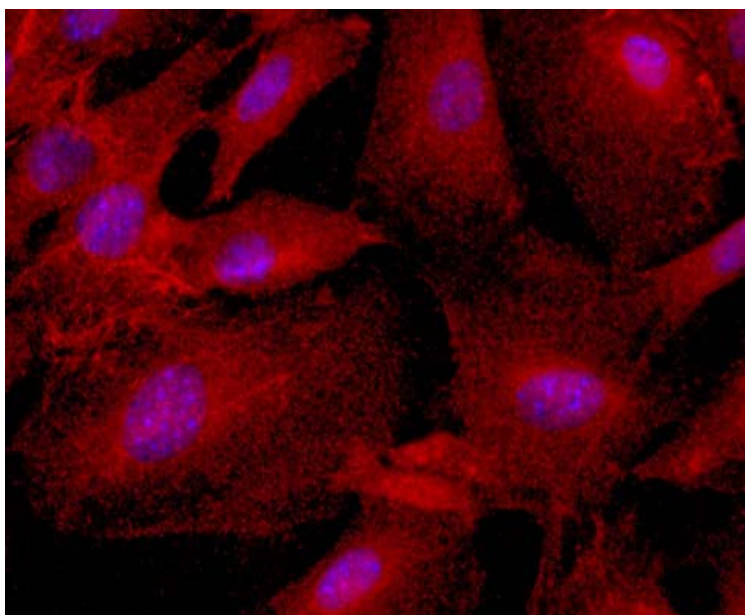


Figura 21. Expresión del factor von Willebrand en el citoplasma de las CEAR. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La tinción se realizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando un AcP de conejo anti-factor von Willebrand humano. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. Imagen tomada al microscopio óptico de fluorescencia (x 400 aumentos).

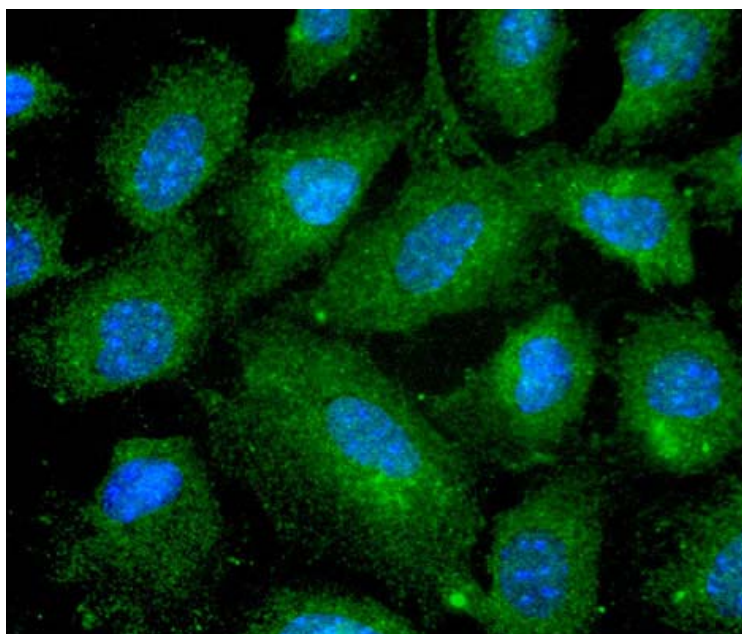


Figura 22. Expresión de PECAM-1 en la membrana plasmática de las CEAR. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La tinción se realizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando un AcP de cabra anti-PECAM-1. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. Imagen tomada al microscopio óptico de fluorescencia (x 400 aumentos).

Figura 23. Expresión de actina en el citoplasma de las CEAR. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La tinción se realizó por inmunofluorescencia directa utilizando como anticuerpo Faloidina conjugada con Oregon Green 488. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. Imagen tomada al microscopio óptico de fluorescencia (x 400 aumentos).

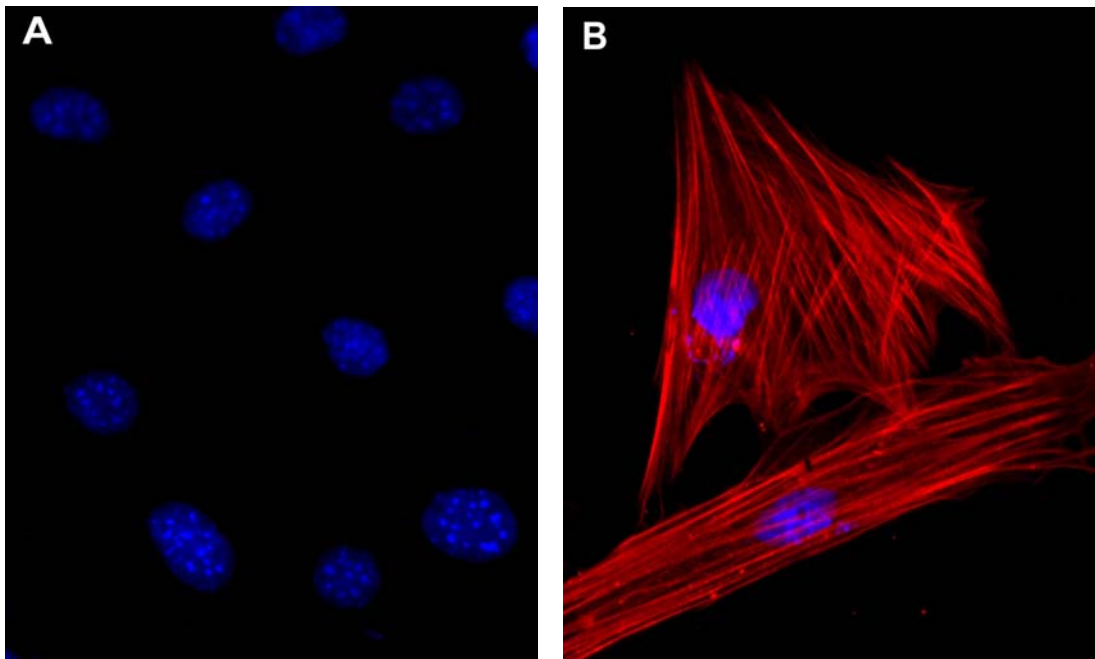
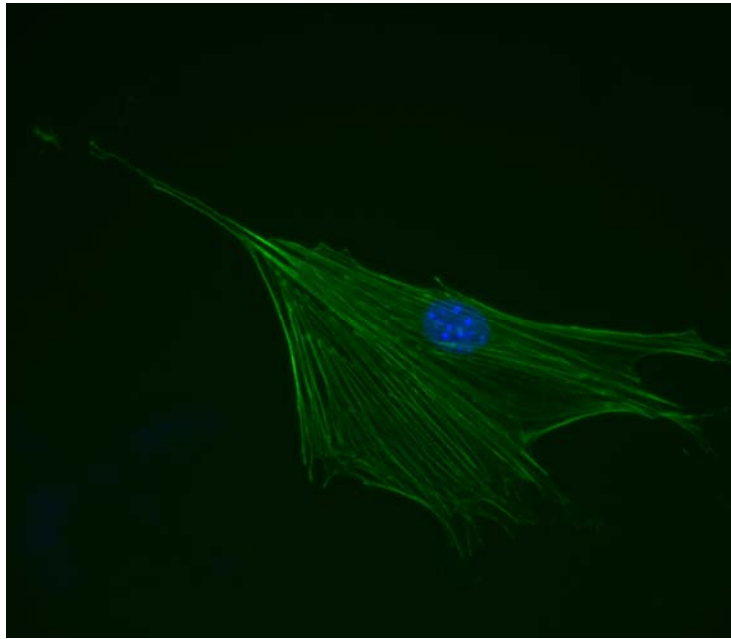


Figura 24. Expresión de actina de músculo liso vascular en el citoplasma de las CEAR (A) y en células de músculo liso vascular de rata (B). Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La tinción se realizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando un AcM de ratón anti-actina de músculo liso vascular, Clon 1A4. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. Imágenes tomadas al microscopio óptico de fluorescencia (x 400 aumentos).

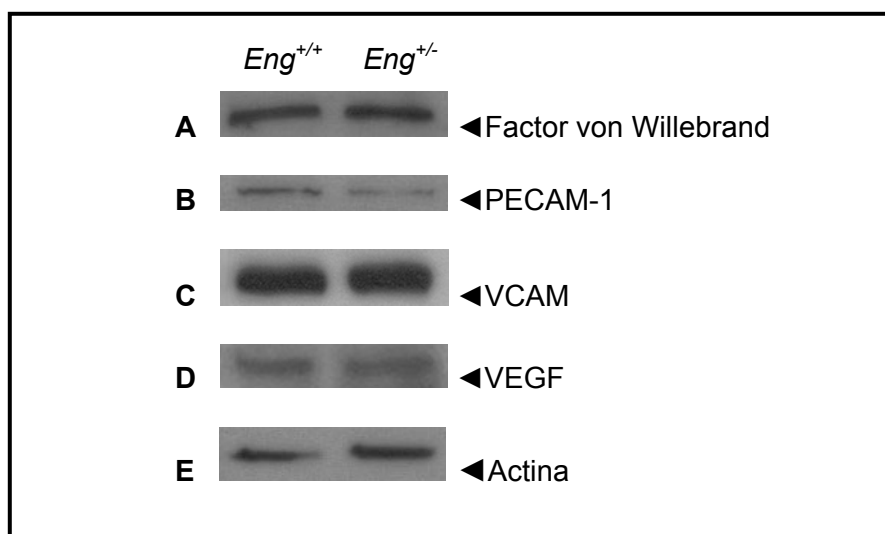


Figura 25. Expresión de marcadores celulares de células endoteliales en lisados de CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando anticuerpos policlonales de conejo (anti-factor Von Willebrand, anti-actina) y de cabra (anti-PECAM-1, anti- VCAM, anti-VEGF).

10. Expresión de endoglina en las CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}

La endoglina se encuentra en altos niveles en el endotelio vascular (Gougos y Letarte, 1988 a) y su expresión se utiliza habitualmente como marcador de células endoteliales (Garlanda y Dejana, 1997).

Analizamos la expresión de endoglina en las CEAR mediante las técnicas de inmunofluorescencia y Western blot. Con estos experimentos pretendíamos, en primer lugar, demostrar la expresión de endoglina en el cultivo primario de células endoteliales y, en segundo lugar demostrar la haploinsuficiencia de endoglina en las CEAR *Eng*^{+/-}.

La endoglina se distribuía homogéneamente en la membrana plasmática de ambos tipos celulares, pero en las CEAR *Eng*^{+/+} la intensidad de tinción era mayor que en las *Eng*^{+/-} (Figura 26). El posterior análisis mediante Western blot demostró que las CEAR *Eng*^{+/-} expresaban aproximadamente un 50% menos endoglina que las *Eng*^{+/+} (Figura 27). Este resultado confirmó la haploinsuficiencia de endoglina en las CEAR provenientes de animales *Eng*^{+/-}.

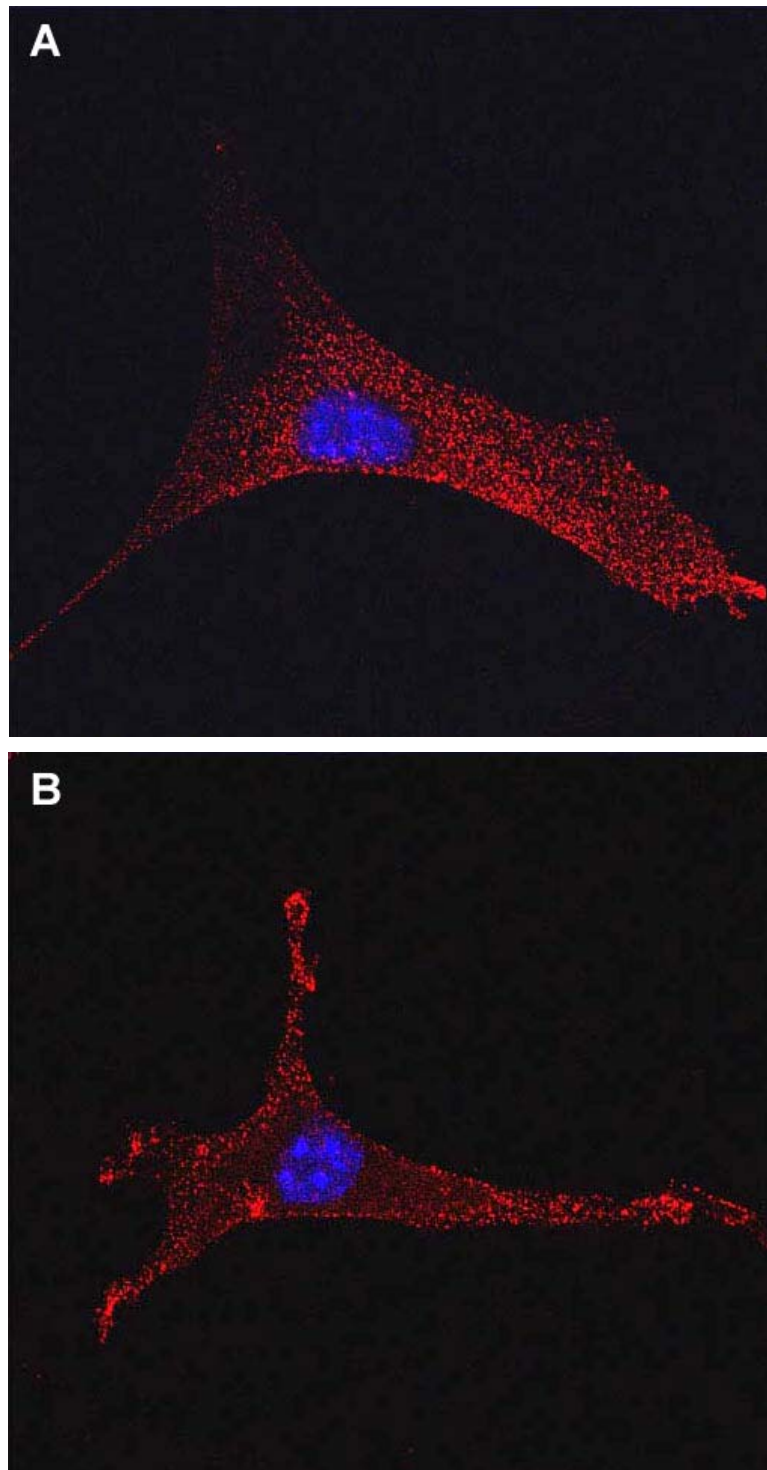


Figura 26. Expresión de endoglina en la membrana plasmática de las CEAR $Eng^{+/+}$ (A) y $Eng^{+/-}$ (B). Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La tinción se realizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando el AcM anti-endoglina de ratón MJ7/18. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. Imagen tomada al microscopio confocal (x 630 aumentos).

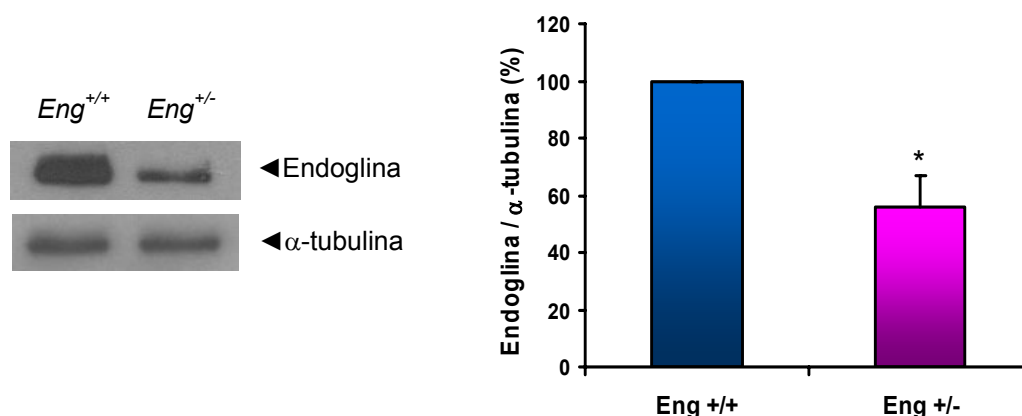


Figura 27. Expresión de endoglina en lisados de CEAR $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando el AcM anti-endoglina de ratón MJ7/18. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. Los datos, obtenidos en tres experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=4). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: *p<0.01 vs CEAR $Eng^{+/+}$.

11. Expresión de eNOS en las CEAR $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$

La expresión de eNOS en el endotelio tiene suma importancia debido a la función del NO en el control del tono vascular (Rees y cols., 1989; Katusic, 1992). Además el NO juega un papel muy importante en el inicio de la angiogénesis (Ziche y cols., 1997; Noiri y cols., 1998).

Dadas las diferencias encontradas en la expresión de eNOS en animales $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$, quisimos evaluar si esas diferencias también existían en las células endoteliales.

Encontramos que las CEAR $Eng^{+/-}$ presentaban unos niveles de eNOS aproximadamente un 30% más reducidos que los de las $Eng^{+/+}$ (Figura 28). Por tanto, la expresión reducida de endoglina que tienen las CEAR $Eng^{+/-}$ se correlaciona con una disminución en la expresión de eNOS, como ya habíamos visto que ocurría en los tejidos estudiados.

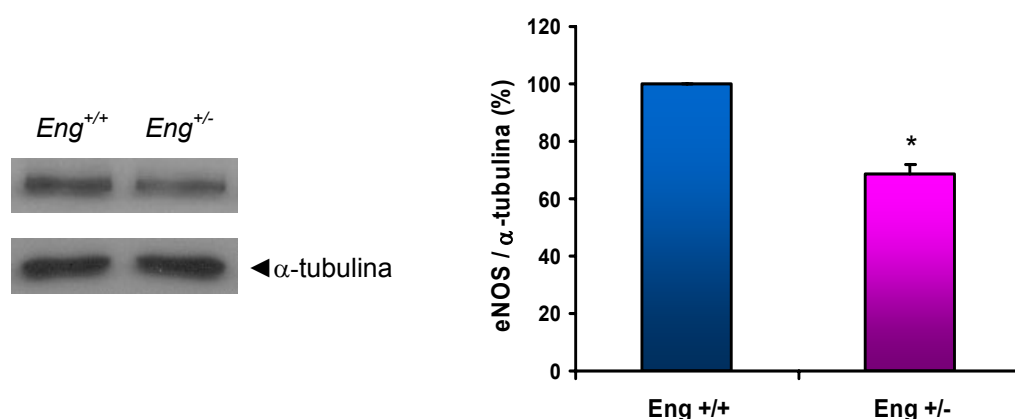


Figura 28. Expresión de eNOS en lisados de CEAR $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando un AcP de conejo anti-eNOS. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. Los datos, obtenidos en dos experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=4). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: * $p < 0.01$ vs CEAR $Eng^{+/+}$.

Estos experimentos demuestran que los cultivos primarios de células endoteliales procedentes de animales $Eng^{+/-}$, son haploinsuficientes en endogлина y que dicha haploinsuficiencia se asocia a una disminución de la expresión de eNOS.

El siguiente objetivo fue estudiar la proliferación, migración y producción de matriz extracelular en estas células y analizar si la deficiencia en endogлина modificaba dichas propiedades biológicas del endotelio, todas ellas fundamentales en procesos angiogénicos.

12. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la proliferación de las CEAR

Utilizamos la técnica colorimétrica de tinción de núcleos con cristal violeta para estudiar el efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la proliferación celular de los cultivos primarios de CEAR. Con esta técnica, determinamos el incremento en el número de células durante ocho días. Obtuvimos curvas de proliferación en el tiempo muy diferentes para las $Eng^{+/+}$ y las $Eng^{+/-}$. A los dos días de sembrar las células, el número de CEAR $Eng^{+/+}$ era todavía similar al número de $Eng^{+/-}$. Sin embargo, las

CEAR *Eng*^{+/+} ya casi habían duplicado a las *Eng*^{+/-} a los cuatro días (22195 ± 879 CEAR *Eng*^{+/+} y 12303 ± 591 CEAR *Eng*^{+/-}). Estas diferencias aumentaron aún más en los días seis y ocho del estudio (58465 ± 1305 CEAR *Eng*^{+/+} y 41420 ± 1196 CEAR *Eng*^{+/-}) (Figura 29).

Como se observa también en la Figura 29, las CEAR *Eng*^{+/+} dejaron de proliferar (probablemente por alcanzar la confluencia) en el día seis, mientras que las *Eng*^{+/-} siguieron proliferando pero a un ritmo mucho más lento. Las *Eng*^{+/-} nunca alcanzaron en número a las *Eng*^{+/+}, debido a que llegaban al estado de confluencia con un número muy inferior de células al de las *Eng*^{+/+} (Figura 29). Probablemente sea la forma mucho más regular de las CEAR *Eng*^{+/+}, la que permite la supervivencia de un número mayor de células en monocapa que en el caso de las *Eng*^{+/-}, cuya forma es mucho más alargada e irregular, como ya hemos comentado anteriormente (Figura 19).

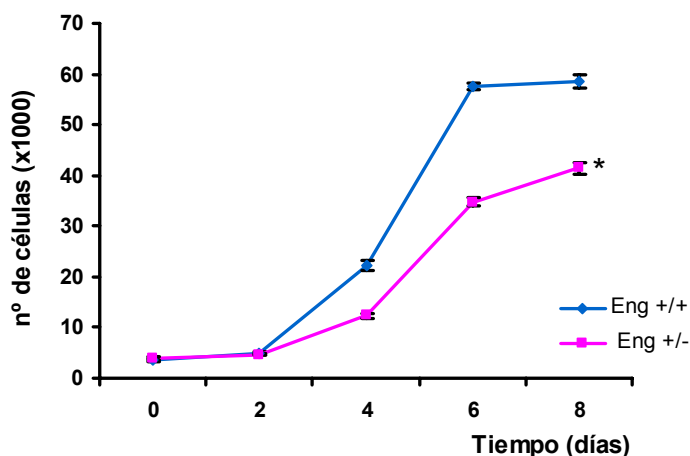


Figura 29. Curvas de proliferación de las CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. Se sembraron 4000 CEAR en cada pocillo y a las 24 horas (tiempo 0) y 2, 4, 6 y 8 días los núcleos de las células se tiñeron con cristal violeta. La absorbancia se midió espectrofotométricamente y se comparó con una curva absorbancia-nº de células previamente elaborada. El experimento se repitió dos veces obteniéndose resultados similares. Los datos se expresan como la media ± EEM (n=6 pocillos). Diferencias estadísticas significativas según el test de Bonferroni: *p<0.01 vs curva CEAR *Eng*^{+/+}

Realizamos además un análisis del ciclo celular de las CEAR mediante citometría de flujo. La haploinsuficiencia de endogлина en estas

células indujo retención del ciclo celular en las fases G0/G1. El número de células que se encontraban en las fases S+G2M era significativamente mayor en las CEAR $Eng^{+/+}$ ($29 \pm 2\%$) que en las $Eng^{+/-}$ ($20 \pm 2\%$) (Figura 30).

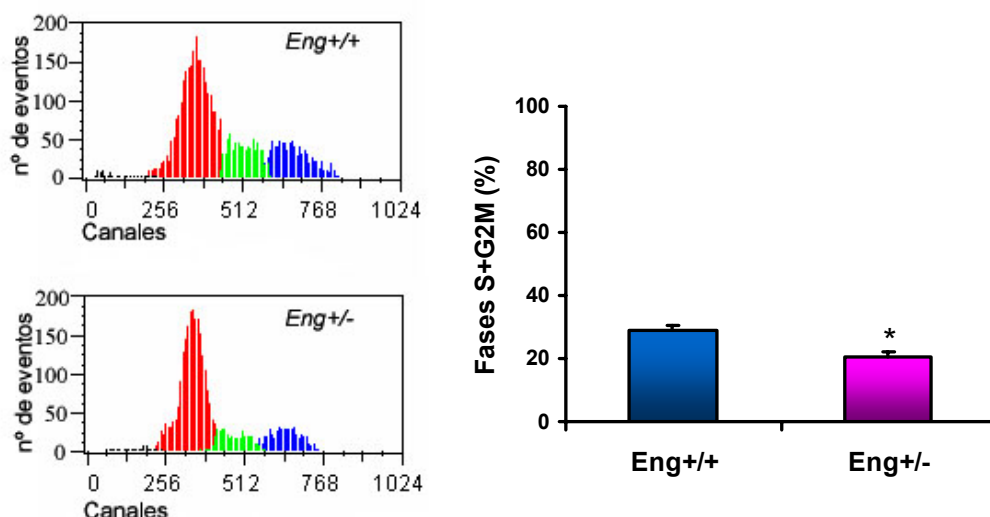


Figura 30. Análisis del ciclo celular de las CEAR $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$ mediante citometría de flujo. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. Las células se tiñeron con yoduro de propidio. **Izquierda.** Histogramas resultantes de la adquisición de las células en el citómetro. ■: células apoptóticas. ■: células en fase G0/G1. ■: células en fase S. ■: células en fase G2/M. **Derecha.** Los datos, obtenidos en cuatro experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM ($n=7$ placas de cultivo). Diferencias estadísticas significativas según el test t de Student: $*p<0.05$ vs CEAR $Eng^{+/+}$.

A la vista de todos estos datos podemos afirmar que la haploinsuficiencia de endogлина produce un descenso en la proliferación de las CEAR. En concordancia con esta afirmación, otros autores han demostrado que la expresión de endogлина en HUVEC es mayor en células en proliferación que en células quiescentes (Burrows y cols., 1995). Li y cols. (2000), utilizando un oligonucleótido antisentido demostraron que la endogлина antagoniza el efecto inhibitorio que el TGF- β 1 tiene sobre la proliferación, la migración y la formación de tubos en las HUVEC. Se ha descrito también que existe una correlación entre los niveles de endogлина y algunos marcadores de proliferación celular (ciclina A y Ki-67) en el endotelio tumoral (Miller y cols., 1999). Además, se ha detectado una fuerte intensidad de tinción para endogлина en células endoteliales vasculares de

tejidos en los que se está produciendo angiogénesis (tejidos en regeneración, inflamados o tumorales) en comparación con la tinción encontrada en las células endoteliales vasculares de tejidos sanos (Miller y cols., 1999; Wang y cols., 1994; Bodey y cols., 1998; Torsney y cols., 2002). Por último, Lebrin y cols. (2004) demuestran con sus experimentos que la endoglina aumenta la proliferación endotelial promoviendo la señalización de TGF- β a través del receptor ALK-1. Estas evidencias indican que los niveles de endoglina regulan la proliferación endotelial.

Es probable que la proliferación más lenta de las CEAR haploinsuficientes tenga su origen en una menor producción de NO, causado por la menor expresión de eNOS en estas células. La expresión reducida de eNOS en las CEAR *Eng*^{+/-} respecto a las CEAR *Eng*^{+/+} se demuestra en este trabajo (Figura 28). Los estudios realizados por Ziche y cols. (1994) en los que afirman que los donadores de NO, como el nitroprusiato, promueven la proliferación y migración de las células endoteliales, mientras que los inhibidores de eNOS inhiben estas respuestas, apoyan esta teoría. Más recientemente se ha demostrado la implicación de la metaloproteinasa 13 en la activación de la migración de las células endoteliales que produce el NO (López Rivera y cols., en prensa).

Por otra parte, sabemos que son numerosas las señales que llegan a las células endoteliales después de la isquemia, algunas de las cuales inducen proliferación (VEGF, bFGF) y otras inducen retención del crecimiento y apoptosis (hipoxia, TGF- β 1). Además, se ha demostrado que las células que sobreexpresan endoglina son más resistentes a los efectos apoptóticos producidos por la isquemia y el TGF- β 1 (Li y cols., 2003). Por tanto, la diferencia en la proliferación entre las CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} podría deberse, al menos en parte, a la diferente respuesta ante los estímulos apoptóticos de unas y otras. Además algunos estudios han demostrado que el NO actúa como un factor de supervivencia de las células endoteliales que puede ser necesario para prevenir la apoptosis de dichas células durante la fase inicial de la angiogénesis (Tzeng y cols., 1997; Dimmeler y cols., 1997).

13. Efecto de la haploinsuficiencia de endoglina en la migración de las CEAR

Estudiamos el efecto de la haploinsuficiencia de endoglina en la migración de las CEAR mediante dos técnicas distintas. En primer lugar analizamos la capacidad de migración de las CEAR a través de membranas de polietileno tereftalato. Los insertos con este tipo de membrana (poros de 8 μm de diámetro) son específicos para estudios de migración celular. Sembramos las CEAR en los insertos y las permitimos migrar a través de estas membranas durante dieciséis horas, desde el medio en el que se encontraban (SBF 2%) hacia un medio más rico en suero (SBF 10%) que nos sirvió como quimioatrayente (Figura 31). Al cuantificar el número de células que habían atravesado la membrana mediante la tinción nuclear con cristal violeta, comprobamos que el número de CEAR *Eng*^{+/-} que habían migrado era un 33.4% menor que el número de *Eng*^{+/+} (Figura 31).

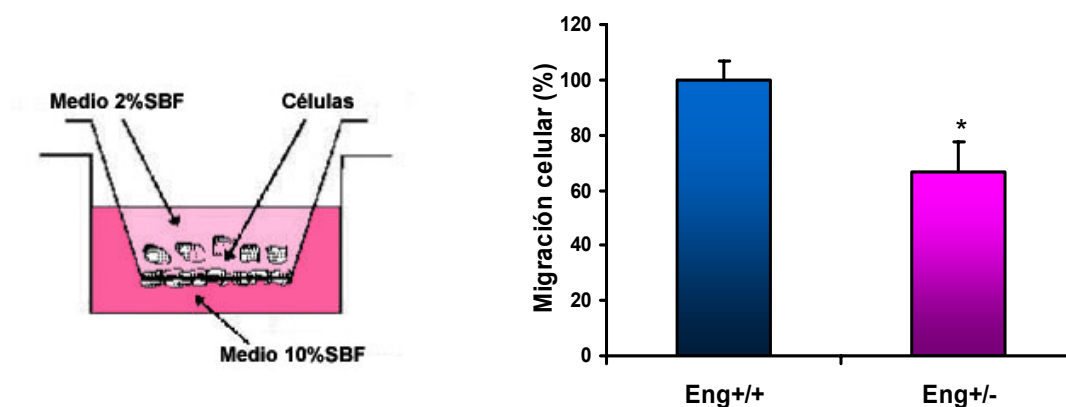


Figura 31. Migración de las CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} hacia un medio más rico en suero. Tal como se observa en el dibujo, se sembraron 100000 CEAR en el inserto con DMEM/HAMF12 1:1, SBF 2% y se incubaron durante dieciséis horas, permitiendo la migración hacia el pocillo que contenía DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. Tras ese tiempo, los núcleos de las células que habían migrado (parte inferior de la membrana) se tiñeron con cristal violeta. La absorbancia se midió espectrofotométricamente. Los datos, obtenidos en cinco experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=12 insertos). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: **p*<0.05 vs CEAR *Eng*^{+/+}.

La segunda técnica utilizada para el estudio de la migración consiste en realizar “heridas” (levantar y retirar las células) en la monocapa de células confluentes y estudiar la migración celular hacia la zona dañada. Para realizar estos experimentos, depleccionamos las células con SBF 2% para evitar que proliferaran y únicamente migraran desde las zonas adyacentes hacia los espacios dañados. Previamente comprobamos que con esta concentración de suero prácticamente no había proliferación celular y que el cultivo primario de CEAR no resultaba dañado. Las CEAR *Eng*^{+/+} migraron visiblemente más hacia las zonas dañadas que las *Eng*^{+/-}, como se aprecia en la Figura 32. A las veinticuatro horas de realizar las “heridas”, obtuvimos una diferencia significativa entre la distancia migrada por las CEAR *Eng*^{+/+} ($38.2 \pm 5.1\%$ respecto a la “herida” inicial) y la distancia migrada por las CEAR *Eng*^{+/-} ($21.9 \pm 4.1\%$) (Figura 32).

A los experimentos de migración expuestos podemos añadir el hecho de que las CEAR *Eng*^{+/-} presentaron una menor capacidad de organizarse en tubos cuando las sembramos en *Matrigel* en comparación con las CEAR *Eng*^{+/+} (Figura 20). En este proceso de formación de estructuras organizadas similares a capilares característico de las células endoteliales es sumamente importante la capacidad de migración.

Estos experimentos *in vitro* demuestran que la haploinsuficiencia de endogлина disminuye la capacidad de migración de las CEAR.

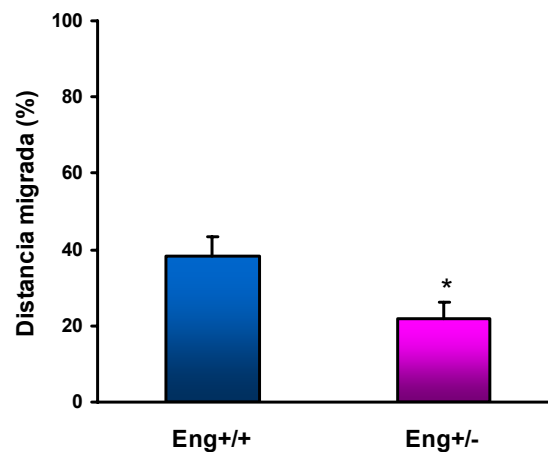
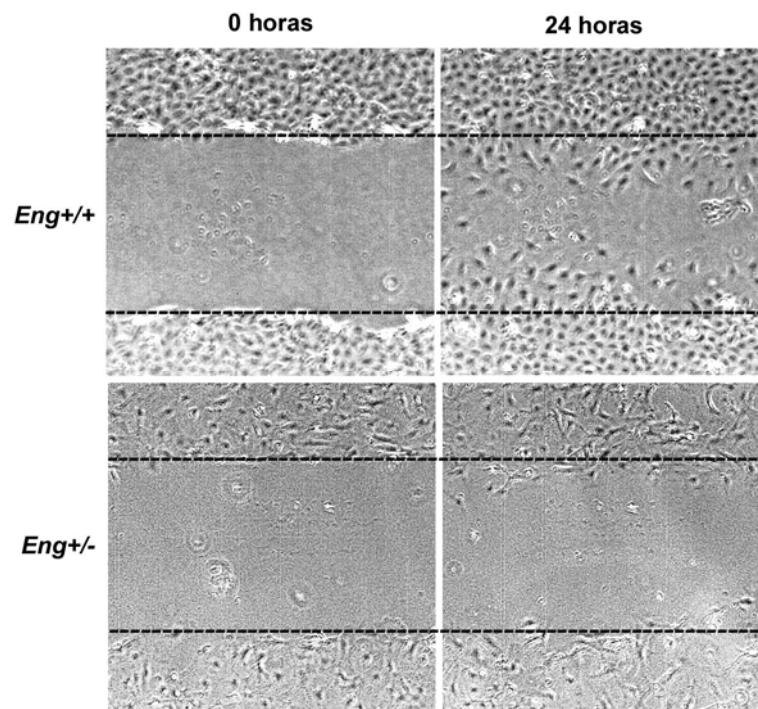


Figura 32. Migración de las CEAR $Eng^{+/+}$ y $Eng^{+/-}$ hacia zonas sin células de la monocapa. Las células se depleccionaron con DMEM/HAMF12 1:1, SBF 2%. A las dieciséis horas se realizaron las “heridas” en la monocapa con una punta de pipeta y veinticuatro horas después se cuantificó la migración celular. Imágenes tomadas al microscopio óptico de contraste de fases (x 40 aumentos). La gráfica representa la cuantificación de la distancia migrada (diferencia entre la distancia inicial sin células y la distancia a las veinticuatro horas). El resultado se corrigió por la distancia inicial. Los datos, obtenidos en dos experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=12). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: * $p < 0.05$ vs CEAR $Eng^{+/+}$.

Varias líneas de investigación han puesto de manifiesto el papel de la endogлина en la modulación de la migración celular *in vivo* e *in vitro*. Algunos autores han demostrado un aumento en la expresión de endogлина en células de músculo liso vascular en respuesta a un daño. Estos autores sugieren que, en estas células, la endogлина es la molécula responsable de la inhibición de la migración celular que produce el TGF- β (Conley y cols., 2000; Ma y cols., 2000). Otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de endogлина en algunos tipos celulares, como los fibroblastos (Guerrero-Esteo y cols., 1999) y las células prostáticas (Liu y cols., 2002), inhibe la migración celular. Incluso se ha descrito un mecanismo para explicar el control que tiene la endogлина sobre la migración celular, basado en la interacción de endogлина con las adhesiones focales (Conley y cols., 2004)

Sin embargo, esta es la primera vez que se demuestra que en cultivos primarios de células endoteliales la haploinsuficiencia de endogлина disminuye la migración celular. Se ha propuesto un modelo para células endoteliales según el cual el aumento de la expresión de endogлина decanta la señalización de TGF- β a través del receptor ALK-1. Esta vía de señalización promueve la proliferación y la migración de las células endoteliales (Goumans y cols., 2002; Lebrin y cols., 2004; Lebrin y cols., 2005; Blanco y cols., 2005).

14. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la acumulación de matriz extracelular en las CEAR

Durante la formación de nuevos vasos, son continuos los procesos de degradación y de deposición de matriz extracelular. En la fase de iniciación, las células endoteliales de los vasos preexistentes producen metaloproteinasas matriciales que degradan la membrana basal que las rodea. Las metaloproteinasas también son necesarias en la degradación de la matriz extracelular que se encuentra delante del nuevo vaso, facilitando así su penetración y acomodación. Por último, en la fase de resolución la membrana basal debe ser reconstituida (Kalluri y cols., 2003).

Algunos estudios *in vitro* han demostrado cómo la expresión de endoglina regula la acumulación de algunos componentes de la matriz extracelular en varios tipos celulares (Lastres y cols., 1996; Letamendía y cols., 1998 b; Guerrero-Esteo y cols., 1999; Díez-Marques y cols., 2002; Obreo y cols., 2004). Todos estos estudios se han realizado en líneas celulares transfectadas con endoglina.

Para comprobar si la haploinsuficiencia de endoglina alteraba la deposición de matriz extracelular en las CEAR, hicimos estudios de expresión de fibronectina y colágeno.

Los niveles de fibronectina, determinados por Western blot, fueron aproximadamente un 20% mayores en las CEAR *Eng*^{+/-} que en las *Eng*^{+/+} (Figura 33). Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, en todos los experimentos encontramos niveles más altos de fibronectina en las CEAR *Eng*^{+/-} que en las *Eng*^{+/+}.

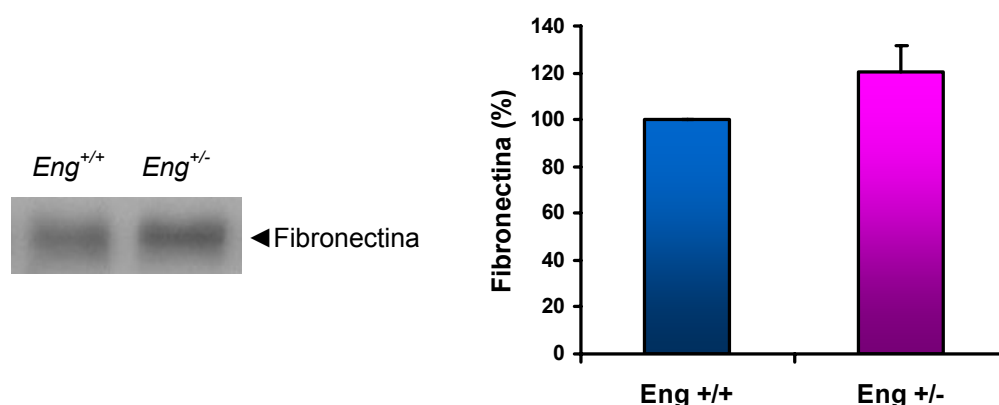


Figura 33. Expresión de fibronectina en lisados de CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando un AcP de conejo anti-fibronectina de ratón. Los datos, obtenidos en cuatro experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=5).

La acumulación de colágeno se determinó por la técnica de incorporación de [³H]-prolina, la cual fue aproximadamente dos veces más alta en las CEAR *Eng*^{+/-} que en las *Eng*^{+/+}. Cuando estimulamos las células con TGF- β 1, la acumulación de colágeno aumentó considerablemente en las *Eng*^{+/+} con respecto al nivel basal (1.8 veces aproximadamente), pero en las

Eng^{+/-} la acumulación de colágeno aumentó en menor medida (alrededor de 1.6 veces). Por otra parte, comprobamos que la acumulación basal no se debe al efecto del TGF-β1 liberado por las células, pues al tratarlas con un anticuerpo neutralizante de TGF-β1, los niveles de colágeno no variaron respecto a los niveles basales, tanto en las CEAR *Eng*^{+/+} como en las CEAR *Eng*^{+/-} (Figura 34).

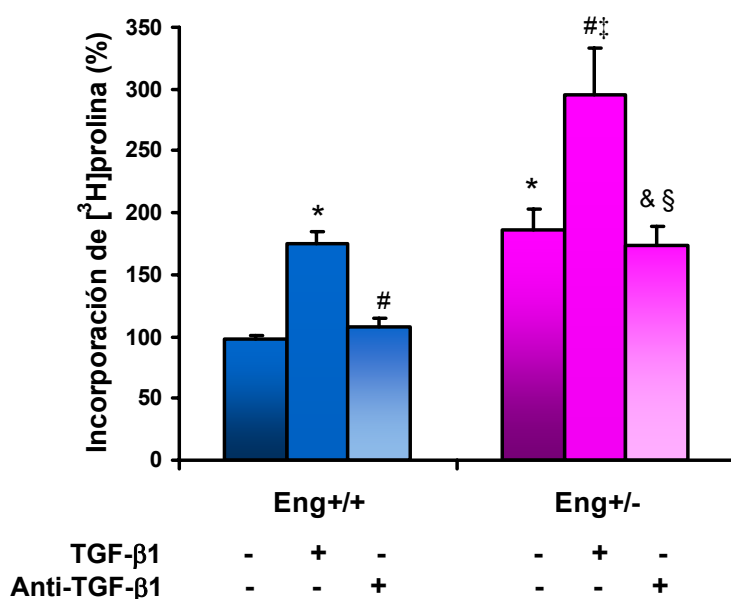


Figura 34. Incorporación de [³H]-prolina a proteínas colágenas en el medio de cultivo de las CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Las células se depleccionaron con DMEM, SBF 2% durante dieciséis horas. Después se incubaron veinticuatro horas con DMEM, SBF 2%, que contenía [³H]-prolina (2 μCi/pocillo) y TGF-β1 (1 ng/mL) o el anticuerpo anti-TGF-β1 (500 ng/mL). Tras veinticuatro horas se recogió el medio de cultivo y se determinó su radiactividad en un contador de partículas β. Los datos, obtenidos en cuatro experimentos diferentes, se expresan como la media ± EEM (n=10 pocillos al menos). Diferencias estadísticas significativas según el test de Kruskal-Wallis: *z>1.96 vs *Eng*^{+/+} sin tratamiento; #z>1.96 vs *Eng*^{+/+} tratadas con TGF-β1; &z>1.96 vs *Eng*^{+/+} tratadas con anti-TGF-β1; †z>1.96 vs *Eng*^{+/-} sin tratamiento; §z>1.96 vs *Eng*^{+/-} tratadas con TGF-β1.

Por tanto, la haploinsuficiencia de endogлина produce un aumento en la acumulación de colágeno en las CEAR. El tratamiento con TGF-β1, estimula dicha acumulación, pero lo hace en mayor medida en las CEAR *Eng*^{+/+} que en las *Eng*^{+/-}.

Mediante Western blot estudiamos la expresión del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) en las CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. El CTGF es una citoquina que está involucrada en la deposición de matriz extracelular mediada por TGF- β (Mori y cols., 1999). Además se ha demostrado que VEGF₁₆₅ puede formar un complejo con CTGF, el cual suprime la actividad angiogénica de VEGF₁₆₅ (Inoki y cols., 2002).

La expresión de CTGF en las CEAR *Eng*^{+/-} fue cinco veces mayor a la expresión en las CEAR *Eng*^{+/+} (Figura 35). La endogлина parece regular la producción de CTGF en las células endoteliales, ya que las células haploinsuficientes tienen unos niveles de la citoquina mucho más altos a los encontrados en las células control.

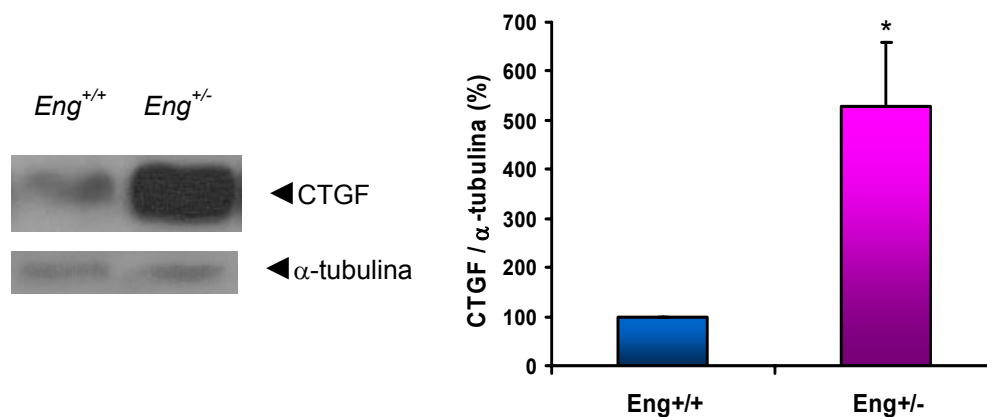


Figura 35. Expresión de CTGF en lisados de CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM/HAMF12 1:1, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando un AcP de cabra anti-CTGF. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. Los datos, obtenidos en dos experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=4). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: *p<0.05 vs CEAR *Eng*^{+/+}.

En base a los resultados anteriores, podemos afirmar que la endogлина juega un papel importante en la regulación de la acumulación de la matriz extracelular en las CEAR. Este hecho ya ha sido demostrado en otros tipos celulares. Lastres y cols. (1996) demostraron que la transfección con endogлина en una línea celular de monocitos producía inhibición de la síntesis de fibronectina inducida por TGF- β 1. Obreo y cols. (2004) realizaron en nuestro laboratorio un estudio del papel de endogлина en la

regulación de la producción de matriz extracelular y en la expresión de CTGF, en mioblastos de rata mock (no expresan endoglina) y transfectados con endoglina. Estos experimentos demuestran que la endoglina regula negativamente la síntesis de colágeno y la expresión de CTGF, tanto en condiciones basales como bajo la estimulación por TGF- β 1. Los resultados obtenidos en las CEAR control y haploinsuficientes de endoglina están en concordancia con estas observaciones.

El exceso de acumulación de matriz extracelular que presentan las CEAR *Eng*^{+/-} podría interferir en las primeras fases de la angiogénesis, cuando se precisa la degradación de la matriz para facilitar la acomodación de los nuevos vasos (Kalluri y cols., 2003).

15. Efecto de la haploinsuficiencia de endoglina en la liberación de VEGF endógeno en las CEAR

El VEGF es probablemente el factor de crecimiento más crítico en la proliferación endotelial y la angiogénesis fisiológica, tanto durante el desarrollo como en la vida post-natal (Ferrara y cols., 2003).

Con el fin de estudiar si la haploinsuficiencia de endoglina alteraba los procesos de síntesis y/o liberación de VEGF, analizamos mediante ELISA los niveles de VEGF liberados al medio de cultivo de las CEAR. En ausencia de estímulos exógenos, los niveles de VEGF en el medio fueron muy superiores en las CEAR *Eng*^{+/+} (33.94 ± 0.97 pg/ μ g de ADN) que en las *Eng*^{+/-} (7.05 ± 0.37 pg/ μ g de ADN). Cuando las células se estimularon con TGF- β 1 los niveles de VEGF aumentaron considerablemente tanto en las CEAR *Eng*^{+/+} (74.54 ± 2.95 pg/ μ g de ADN) como en las *Eng*^{+/-} (30.77 ± 0.84 pg/ μ g de ADN). No obstante, hay que señalar que este aumento es proporcionalmente mayor en el caso de las células haploinsuficientes. En un experimento paralelo tratamos las células con un anticuerpo neutralizante del TGF- β 1, para comprobar que las diferencias en los niveles basales de VEGF no se debían a una diferencia en los niveles de TGF- β . Eliminamos esta posibilidad al comprobar que el bloqueo de TGF- β 1 no

varió la producción de VEGF ni en las CEAR *Eng*^{+/+} (33.73 ± 2.77 pg/ μ g de ADN) ni en las *Eng*^{+/-} (7.39 ± 0.62 pg/ μ g de ADN) (Figura 36).

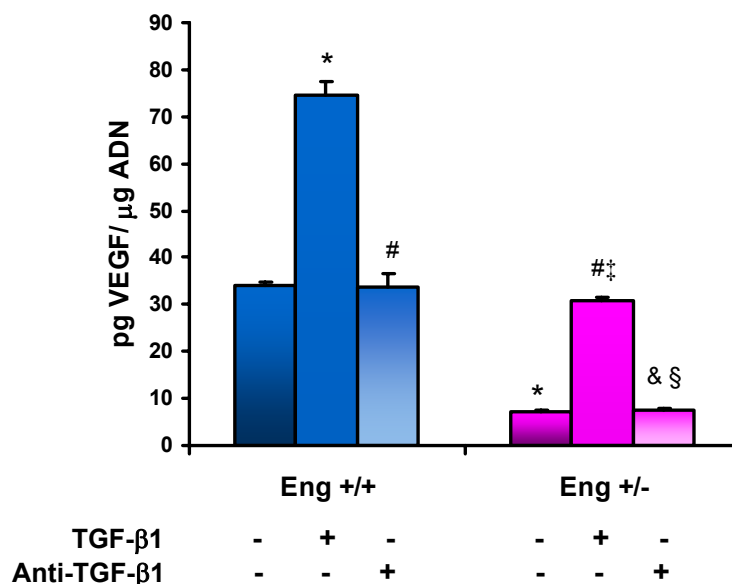


Figura 36. Secreción de VEGF al medio de cultivo de las CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Las células se depleccionaron dieciséis horas con DMEM-HAMF12, SBF 2%. A continuación se trataron con TGF- β 1 (1 ng/mL) o el anticuerpo anti-TGF- β 1 (500 ng/mL). Se recogió el medio de cultivo y la cantidad de VEGF se determinó mediante ELISA. Los datos, obtenidos en dos experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=6 pocillos para el basal y el tratamiento con TGF- β 1 y n=3 pocillos para el tratamiento con anti-TGF- β 1). Diferencias estadísticas significativas según el test de Sheffe: *p<0.05 vs *Eng*^{+/+} sin tratamiento; #p<0.05 vs *Eng*^{+/+} tratadas con TGF- β 1; &p<0.05 vs *Eng*^{+/+} tratadas con anti-TGF- β 1; †p<0.05 vs *Eng*^{+/-} sin tratamiento; § p<0.05 vs *Eng*^{+/-} tratadas con TGF- β 1.

Algunos experimentos *in vitro* han demostrado que el VEGF estimula la degradación de matriz extracelular, la proliferación, la migración y la formación de tubos a partir de células endoteliales (Liekens y cols., 2001). Entonces, las diferencias encontradas entre las CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} en la proliferación, migración, producción de matriz extracelular y formación de tubos en *Matrigel*, podrían ser debidas a las diferencias en la producción endógena de VEGF en los dos tipos de cultivos primarios.

Además se sabe que el NO modula la liberación de muchas citoquinas reguladoras de procesos inflamatorios y angiogénicos, entre ellas el VEGF

(Kofler y cols., 2004; Wang y cols., 2004). En este sentido, Namba y cols. (2003) han demostrado con un modelo de isquemia de la pata trasera en rata, que la estimulación de la angiogénesis producida por el NO puede ser debida a la regulación de la expresión de VEGF local. También se ha demostrado que, en las células endoteliales, los efectos mitogénicos de VEGF están mediados por el NO (Morbideilli y cols., 1996; Ziche y cols., 1997). Por tanto, las diferencias encontradas en la liberación de VEGF entre las CEAR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} podrían deberse, al menos en parte, a la diferente expresión de eNOS en unas y otras. Serían necesarios nuevos experimentos para confirmar esta hipótesis.

16. Resumen de los estudios de angiogénesis *in vivo* e *in vitro*

Como demuestran nuestros resultados, los animales haploinsuficientes en endoglina sufren un retraso en el proceso de neovascularización post-isquémica. Este es el primer estudio que demuestra el papel de la endoglina en la angiogénesis del individuo adulto, pues hasta ahora solo se había reconocido el papel de esta proteína en la angiogénesis fetal.

Esta deficiencia en la angiogénesis no parece tener su origen en los principales factores de crecimiento angiogénico, pues no apreciamos grandes diferencias en la expresión de estos factores (VEGF, COX-2, TGF- β 1) entre los animales control y los haploinsuficientes tras la isquemia.

También hemos demostrado que la inhibición de la síntesis de NO, reduce la angiogénesis post-isquémica en los animales *Eng*^{+/+}, y también en los *Eng*^{+/-} aunque en menor medida. Estos datos sugieren que la menor angiogénesis que presentan los animales *Eng*^{+/-} podría tener su origen en una menor expresión de NO en estos animales. Además hemos comprobado que la expresión de eNOS en los tejidos normales, tejidos isquémicos, y células endoteliales, es menor en los animales *Eng*^{+/-} que en los *Eng*^{+/+}.

Las células endoteliales procedentes de la aorta de los ratones haploinsuficientes presentan una menor tasa de proliferación y migración y una mayor acumulación de componentes de la matriz extracelular que las extraídas de los animales control. Este hecho demuestra la importancia de endoglina en los procesos de proliferación, migración y producción de matriz extracelular en las células endoteliales. Estas propiedades biológicas del endotelio son fundamentales durante la angiogénesis.

Las CEAR *Eng*^{+/+} liberan al medio de cultivo una cantidad más de cuatro veces superior de VEGF que las *Eng*^{+/-}. Las diferencias halladas en la proliferación, migración y acumulación de matriz en estas células podrían deberse a las diferencias en la liberación de VEGF, pues se ha demostrado que este factor de crecimiento modula dichas propiedades en las células endoteliales. En este proceso también podría estar involucrado el NO.

Nosotros hemos demostrado que las CEAR *Eng*^{+/-} expresan menos eNOS que las *Eng*^{+/+} y sabemos que existe una interrelación entre NO y VEGF. Por una parte se ha demostrado que el NO modula la liberación de VEGF y por otra se sabe que los efectos mitogénicos de VEGF están mediados por NO.

En base a los resultados anteriores, la deficiencia en la angiogénesis post-isquémica que encontramos en los animales *Eng*^{+/-}, podría explicarse por la menor proliferación y migración que presentan las CEAR *Eng*^{+/-} en comparación con las *Eng*^{+/+}. La producción excesiva de matriz extracelular en las CEAR *Eng*^{+/-} también podría interferir en el proceso de angiogénesis de estos animales.

17. Cicatrización de heridas cutáneas en ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}

El segundo gran objetivo de este trabajo fue el estudio de la implicación de endogлина en la cicatrización de heridas. Como la angiogénesis es fundamental en los procesos de reparación (Folkman y Shing, 1992), pensamos que la endogлина también podría estar implicada en ellos. Además, en la cicatrización es fundamental la producción de matriz extracelular, proceso del que endogлина es un potente regulador (Lastres y cols., 1996; Letamendía y cols., 1998 b; Guerrero-Esteo y cols., 1999; Diez-Marques y cols., 2002; Obreo y cols., 2004).

Para analizar la implicación de endogлина en los procesos de cicatrización utilizamos un modelo de inducción de heridas cutáneas en los animales, con el que evaluamos el tiempo en que se cierran las heridas.

Observamos un retraso en la cicatrización de las heridas en los animales *Eng*^{+/-} con respecto a los animales *Eng*^{+/+}. Este retraso es significativo en los días segundo y cuarto después de hacer las heridas. Por ejemplo, en el día segundo, las heridas realizadas en la piel de los animales *Eng*^{+/+} se habían cerrado un $33 \pm 2\%$ respecto a la herida inicial, mientras que las heridas de los *Eng*^{+/-} solamente se habían cerrado un $20 \pm 2\%$. Estas diferencias se fueron reduciendo con el tiempo. Al final, el tiempo que tardaron las heridas en cerrarse totalmente fue el mismo en los dos tipos de animales (alrededor de doce días) (Figura 37).

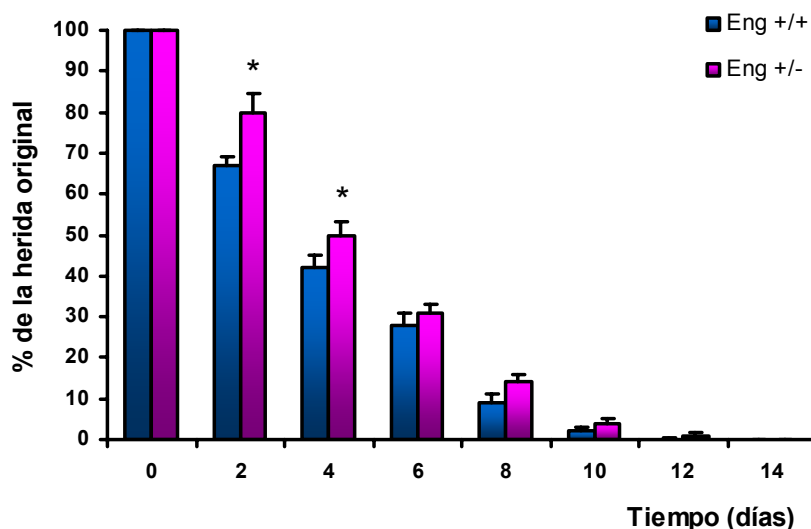


Figura 37. Evolución de la cicatrización de las heridas cutáneas en los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. El área de cada herida se calculó como porcentaje de la herida inicial. Los datos se expresan como la media \pm EEM (n=10 animales, 20 heridas). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: * $p < 0.05$ vs animales *Eng*^{+/+} en el mismo tiempo.

Al igual que ocurría con el modelo de reperfusión post-isquémica, este experimento demuestra la importancia que tienen los niveles de endogлина en los procesos de reparación.

Torsney y cols. (2002) demostraron que la expresión de endogлина aumenta en las células endoteliales durante la cicatrización de heridas, probablemente en parte por el aumento de TGF- β 1. Anteriormente ya se había estudiado la expresión de endogлина en la piel bajo una condición patológica: la expresión de endogлина fue mayor en la piel afectada por psoriasis que la expresión en la piel sana (Rulo y cols. 1995).

El retraso en la cicatrización encontrado en los animales haploinsuficientes puede ser en parte debido a la deficiente angiogénesis (deficiente proliferación y migración y exceso de acumulación de matriz extracelular por parte de las células endoteliales) que presentan los animales *Eng*^{+/-}, en comparación con sus hermanos de camada *Eng*^{+/+}, como hemos demostrado anteriormente. La proliferación y migración deficiente de las células endoteliales podría retrasar la angiogénesis, fundamental en los

procesos de cicatrización. Algunos autores han demostrado que la cicatrización de heridas se acelera con la estimulación de la migración de las células endoteliales y la angiogénesis (Malinda y cols., 1998).

Por otra parte, se ha sugerido que la endoglina puede jugar un papel importante en la transmigración de leucocitos, puesto que se han encontrado niveles altos de la proteína en células endoteliales que llevan asociado un infiltrado inflamatorio, como ocurre en los tejidos inflamados (Torsney y cols., 2002). En nuestro modelo, la haploinsuficiencia de endoglina podría retrasar el proceso de cicatrización, pues la falta de unos niveles adecuados de la proteína puede desfavorecer el proceso de infiltrado de células inflamatorias en el área lesionada. Las células inflamatorias, neutrófilos y macrófagos principalmente, son fundamentales en la primera fase de la cicatrización, no sólo porque limpian la herida de gérmenes y cuerpos extraños, sino también porque producen las citoquinas inflamatorias necesarias en las fases posteriores de la cicatrización (Hubner y cols., 1996; Singer y Clark, 1999; Martín, 1997).

18. Cicatrización de heridas cutáneas en ratones

***Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} tratados con L-NAME**

Nuestro siguiente objetivo fue el estudio de la cicatrización de heridas en animales previamente tratados con L-NAME, para comprobar si la deficiencia en los niveles de eNOS que presentan los animales *Eng*^{+/-}, es también determinante en el retraso en la cicatrización encontrado en estos animales, como ocurría con la reperusión post-isquémica. La efectividad de la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME se demuestra por el descenso en los niveles de nitritos en plasma que presentan los animales tratados (Figura 13).

Cuando tratamos los animales con L-NAME, inhibiendo así la producción de NO, observamos que las curvas de cicatrización de heridas en los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} se solapan (Figuras 38 y 39). La evolución del cierre de las heridas tanto en los animales *Eng*^{+/+} como en los *Eng*^{+/-}

tratados con L-NAME es similar a la de los animales *Eng*^{+/+} sin tratar (Figura 39).

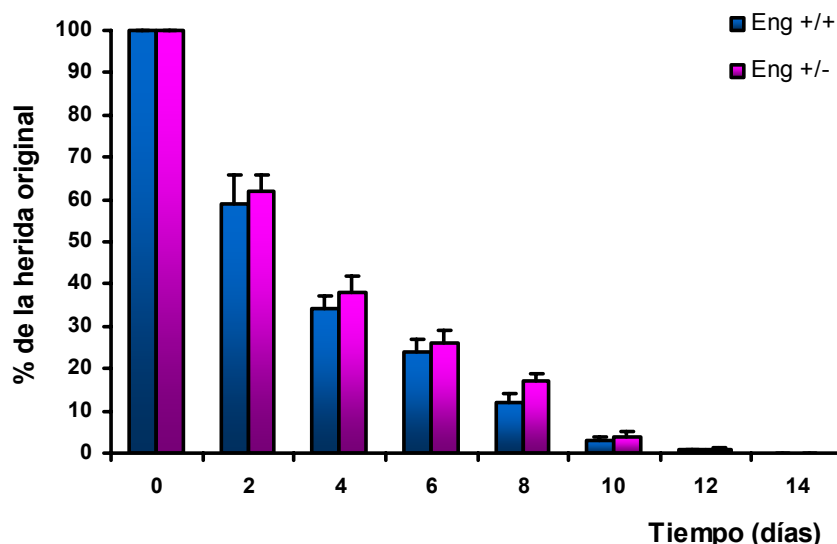


Figura 38. Evolución de la cicatrización de las heridas cutáneas en los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} tratados con L-NAME (10 mg/Kg/día) en el agua de bebida. El área de cada herida se calculó como porcentaje de la herida inicial. Los datos se expresan como la media ± EEM (n=6 animales, 12 heridas).

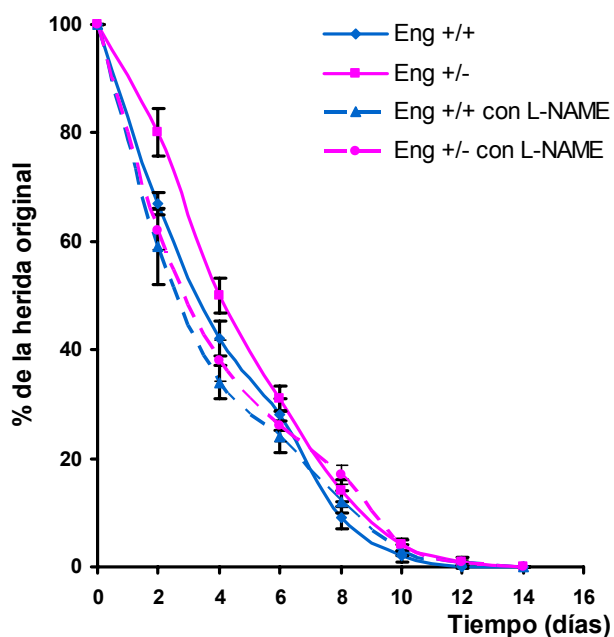


Figura 39. Evolución de la cicatrización de las heridas cutáneas en los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} tratados y no tratados con L-NAME (10 mg/Kg/día) en el agua de bebida. El área de cada herida se calculó como porcentaje de la herida inicial. Los datos se expresan como la media ± EEM (n=10 animales no tratados, 20 heridas; n=6 animales tratados, 12 heridas). Diferencias estadísticas significativas según el test de Bonferroni: curva *Eng*^{+/-} vs curva *Eng*^{+/+}, curva *Eng*^{+/-} con L-NAME vs curva *Eng*^{+/-}, p<0.05.

Según este resultado, el papel del NO en el proceso de cicatrización no está muy claro, pues al inhibir su producción con L-NAME en los animales control (*Eng^{+/+}*), la curva de cicatrización no varía significativamente respecto a la de los animales sin tratar. El hecho de que la cicatrización de los animales *Eng^{+/-}* tratados con L-NAME sea más rápida que la cicatrización en los animales *Eng^{+/-}* sin tratar hace pensar que el retraso en la cicatrización que presentan estos animales respecto a los control sea por un exceso en la producción de NO en las heridas, y que se subsanaría con la administración de L-NAME. Sin embargo esta hipótesis no encaja *a priori* con los resultados obtenidos hasta ahora, en los que se demuestra que tanto en los tejidos de los animales haploinsuficientes, como en las células endoteliales obtenidas de estos animales, los niveles de eNOS son más bajos que los niveles de los animales control.

Existen bastantes estudios sobre el papel del NO en los procesos de cicatrización. Se han encontrado altas concentraciones de los metabolitos de la degradación del NO (nitritos y nitratos) en heridas (Albina y cols., 1990). Además, la administración sistémica de L-arginina, un sustrato de la síntesis de NO, tiene un efecto beneficioso en la cicatrización (Barbul y cols., 1990; Kirk y cols., 1993). La aplicación tópica de donadores de NO acelera el cierre de las heridas practicadas en la piel de ratas (Shabani y cols., 1996), mientras que los inhibidores de NOS administrados de forma sistémica (Schaffer y cols., 1996) o tópica (Bulgrin y cols., 1995) retrasan la cicatrización. En ratones *knockout* para iNOS el cierre de las heridas se retrasa un 31% respecto al cierre en los animales control. Además el retraso se revierte cuando se realiza una transfección con iNOS humana (Yamasaki y cols., 1998). Algo parecido ocurre con los ratones *knockout* para eNOS, en los cuales el cierre de las heridas es más lento y la fuerza tensil de la herida cicatrizada es menor que en los animales control (Lee y cols., 1999). En resumen, el NO producido por iNOS y eNOS tiene una función importante en el proceso de cicatrización, desde la fase inflamatoria hasta el remodelado de la cicatriz. El NO actúa como quimiotáctico y vasodilatador durante las fases tempranas de la reparación, regula la proliferación y la diferenciación de muchos tipos celulares, modula la deposición de colágeno y la angiogénesis y afecta también a la contracción de la herida. Se ha sugerido

que todas estas acciones se producen por la capacidad que tiene el NO de modular diversas citoquinas involucradas en la cicatrización, como VEGF, TGF- β 1 y MCP-1 (Schwentker y cols., 2002).

A la vista de todos estos datos de la literatura, parece claro el efecto beneficioso del NO en la curación de las heridas. Sin embargo, en nuestro modelo no apreciamos que la cicatrización se vea retrasada con la inhibición de la NOS. Es posible que la administración de L-NAME según nuestro método no inhiba totalmente la síntesis de NO. En este caso, el NO en la herida podría ser suficiente para que la cicatrización no se viera afectada. Hay autores que aseguran que la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME no es total (Cohen y cols., 1997).

En el caso de los ratones haploinsuficientes, la administración de L-NAME acelera la cicatrización de las heridas. Esto podría explicarse porque existiera un exceso de NO en la herida. No tenemos conocimiento de ningún trabajo que exponga que un exceso de NO pueda perjudicar la cicatrización. Sin embargo hay estudios que demuestran que la cantidad excesiva de NO, al mismo tiempo que un aumento en la producción de ión superóxido, puede generar un acúmulo de peroxinitritos, la nitración de proteínas como la tirosina y la producción de radicales hidroxilo, con el consecuente daño tisular (Beckman y Koppenol, 1996; Cho, 2001).

No debemos tampoco olvidar que la haploinsuficiencia de endoglin podría estar afectando a la expresión o represión de otros genes que aquí no estamos considerando.

Con el fin de estudiar este fenómeno a nivel celular, nos planteamos el análisis de la función de los fibroblastos de piel de animales haploinsuficientes.

19. Cultivo de fibroblastos de piel de ratones *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}

Los fibroblastos son células fundamentales en los procesos de reparación por su capacidad de síntesis de componentes de la matriz extracelular que sustituyen en la herida a la red inicial de fibrina (Singer y Clark, 1999; Martín, 1997; Wang y cols., 2004). Por este motivo pensamos que en el retraso en la cicatrización observado en los animales deficientes de endogлина, también podían estar involucradas alteraciones en la función de los fibroblastos de la piel. La haploinsuficiencia de endogлина podría modificar algunas características biológicas de estas células (migración, proliferación, producción de matriz extracelular) esenciales para el proceso de cicatrización. La modificación de las características biológicas producidas por una mayor o menor expresión de endogлина ha sido demostrada en algunas líneas celulares (Guerrero-Esteo y cols., 1999; Lastres y cols., 1996; Obreo y cols., 2004). Además, nosotros (en este trabajo) y otros investigadores (Lebrin y cols., 2004) hemos demostrado que la haploinsuficiencia de endogлина modifica las características biológicas de las células endoteliales en cultivo primario.

Con el fin de evaluar si la haploinsuficiencia de endogлина modificaba las propiedades biológicas de los fibroblastos de piel relacionadas con la cicatrización, nos propusimos generar un cultivo primario de fibroblastos a partir de la dermis de los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Obtuvimos con éxito estos cultivos siguiendo un protocolo descrito previamente (Bradshaw y cols., 1999). Antes de su utilización, las células se levantaron con tripsina y se resembraron cuatro veces. De esta manera eliminamos los posibles queratinocitos residuales, que pueden contaminar el cultivo. Las monocapas de fibroblastos de piel de ratón (FPR) presentaban una morfología fusiforme característica de los fibroblastos en cultivo. Por otra parte, no encontramos diferencias aparentes al microscopio óptico ni en el tamaño ni en la morfología entre los FPR *Eng*^{+/+} y los *Eng*^{+/-} (Figura 40).

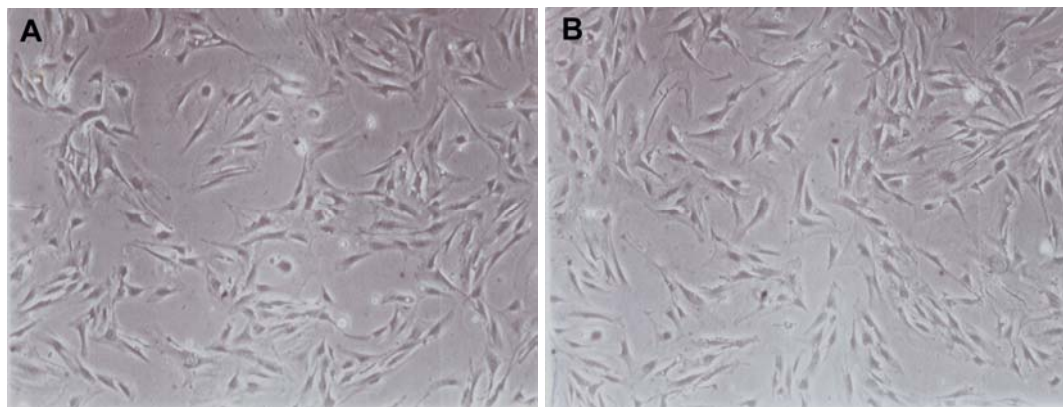


Figura 40. Cultivos de FPR *Eng*^{+/+} (A) y *Eng*^{+/-} (B) en pase 4. Medio de cultivo: DMEM, SBF 10%. Imágenes tomadas al microscopio óptico de contraste de fases (x 40 aumentos).

Los miofibroblastos son una forma diferenciada de fibroblastos con mayor capacidad sintética y capaces de migrar a través de las heridas. Probablemente sea el aumento de TGF- β 1 en la herida el que provoca esta diferenciación morfológica y funcional de los fibroblastos (Vaughan y cols., 2000). Como los miofibroblastos expresan actina de músculo liso vascular (Vaughan y cols., 2000), analizamos mediante inmunofluorescencia si los FPR aislados expresaban esta proteína. Prácticamente el 100% de los FPR analizados tanto procedentes de animales *Eng*^{+/+} como de *Eng*^{+/-}, presentaban fibras de actina de músculo liso vascular (Figura 41).

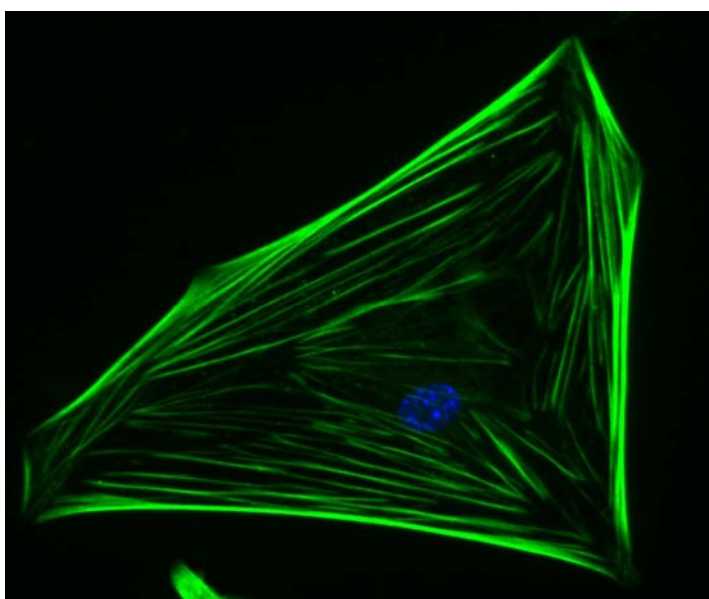


Figura 41. Expresión de actina de músculo liso vascular en el citoplasma de los FPR. Medio de cultivo: DMEM, SBF 10%. La tinción se realizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando un AcM de ratón anti-actina de músculo liso vascular, Clon 1A4. Los núcleos se tiñeron con Hoechst. Imágenes tomadas al microscopio óptico de fluorescencia (x 400 aumentos).

20. Expresión de endoglina en los FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}

Una vez obtenidos los cultivos de fibroblastos, nuestro primer objetivo fue analizar si estas células expresaban endoglina y, en caso de que así fuera, comprobar la haploinsuficiencia de endoglina en los FPR *Eng*^{+/-}. Realizamos el análisis mediante Western blot.

Los FPR *Eng*^{+/-} expresaban aproximadamente un 50% menos endoglina que los *Eng*^{+/+} (Figura 42). Este resultado confirmó la haploinsuficiencia de endoglina en los FPR provenientes de animales *Eng*^{+/-}.

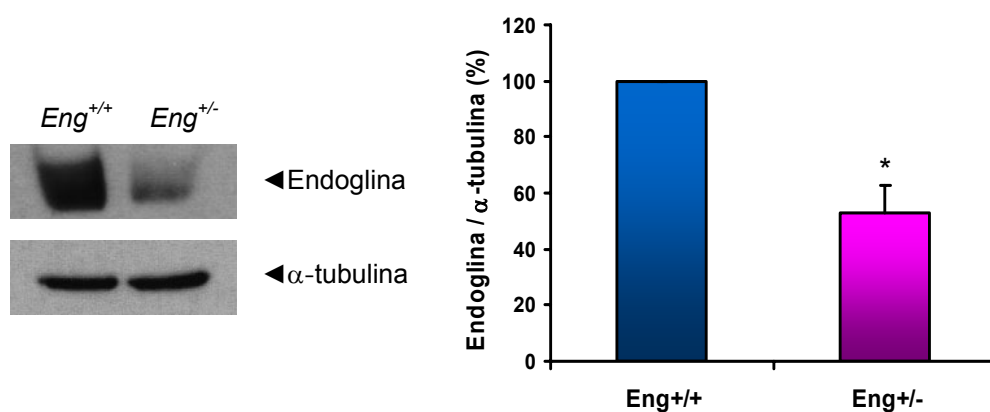


Figura 42. Expresión de endoglina en lisados de FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando el AcM anti-endoglina de ratón MJ7/18. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. Los datos, obtenidos en cinco experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=5). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: **p*<0.01 vs FPR *Eng*^{+/+}.

La expresión de endoglina en fibroblastos ya ha sido demostrada previamente (St-Jacques y cols., 1994). Además, Torsney y cols. (2002), han demostrado expresión de endoglina en miofibroblastos, la forma diferenciada de fibroblastos capaz de migrar a través de las heridas. Es probable que la expresión de endoglina sea importante para modular la respuesta de los miofibroblastos y el endotelio al TGF- β 1 exógeno, el cual es liberado por plaquetas, macrófagos y leucocitos durante los procesos de inflamación y cicatrización (Assoian y cols., 1987; Grainger y cols., 2000).

En otro trabajo, Leask y cols., (2002) estudiaron la expresión de endogлина en fibroblastos dérmicos cultivados a partir de áreas lesionadas de pacientes con escleroderma, una enfermedad sistémica crónica caracterizada por la producción de fibrosis en la piel y en ciertos órganos internos (Black, 1993). Estos autores demostraron un aumento de la expresión de endogлина en los fibroblastos obtenidos de zonas dañadas respecto a los fibroblastos control. Además, la expresión de endogлина aumentaba en los fibroblastos con la progresión de la enfermedad. Por último, Chen y cols. (2004) han demostrado en un estudio reciente expresión de endogлина en un cultivo primario de fibroblastos cardiacos.

21. Expresión de eNOS en los FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}

Una vez confirmada la haploinsuficiencia de endogлина en los fibroblastos *Eng*^{+/-}, decidimos comprobar si en este tipo celular también existía la relación eNOS-endogлина que hemos demostrado previamente (Jerkic y cols., 2004). La expresión de NOS (eNOS e iNOS) en fibroblastos de piel ya ha sido demostrada anteriormente (Wang y cols., 1996). Estos autores sugieren que el NO producido por los fibroblastos de piel, junto al producido por los macrófagos y otras células proinflamatorias, podría tener importancia durante la fase inflamatoria de la cicatrización y posiblemente también en las fases de proliferación y remodelación.

Cuando analizamos los niveles de eNOS en los lisados de fibroblastos, encontramos que en los FPR haploinsuficientes en endogлина la expresión era significativamente mayor (aproximadamente un 30%) que en los FPR procedentes de animales *Eng*^{+/+}.

Para profundizar en esta relación, realizamos una transfección de los FPR *Eng*^{+/+} con endogлина humana y comprobamos cómo en estas células la hiperexpresión de endogлина disminuía la expresión de eNOS respecto a los fibroblastos transfectados con el vector vacío (Figura 44).

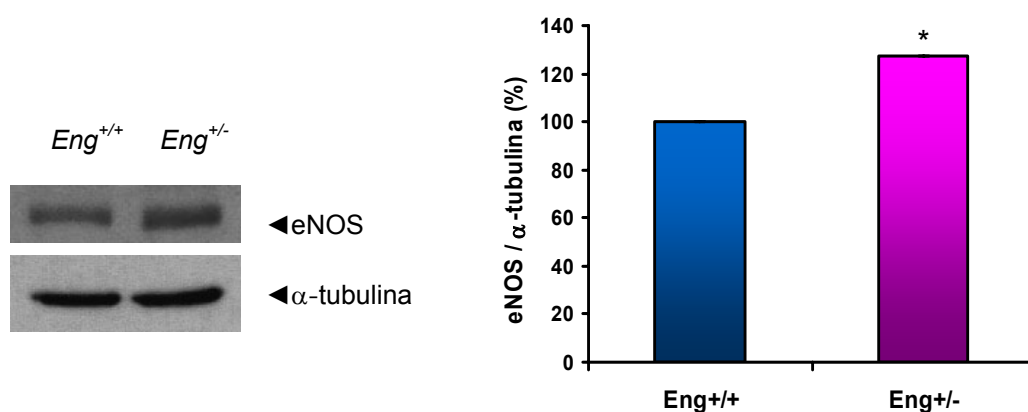


Figura 43. Expresión de eNOS en lisados de FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando un AcP de conejo anti-eNOS. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. Los datos, obtenidos en tres experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=3). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: *p<0.01 vs FPR *Eng*^{+/+}.

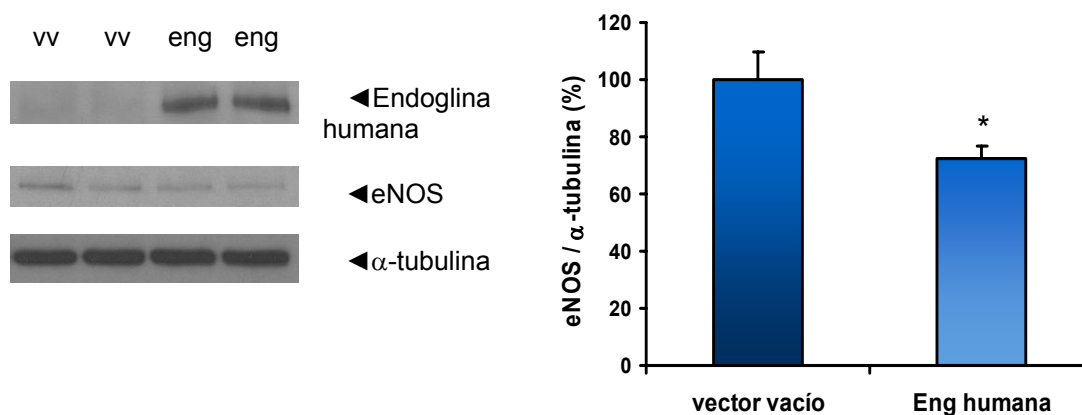


Figura 44. Expresión de eNOS en lisados de FPR *Eng*^{+/+} transfectados con endoglina humana. Las células se transfectaron con endoglina humana o con el vector vacío (pCHV5) mediante el reactivo de transfección jetPEI™. Medio de cultivo: DMEM, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando el AcM anti-endoglina humana TEA 1/58-1 y un AcP de conejo anti-eNOS. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. Los datos, obtenidos en tres experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=5). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: *p<0.05 vs FPR *Eng*^{+/+}. Vv: Transfección con el vector vacío. Eng: Transfección con endoglina humana.

El aumento en la expresión de eNOS en los FPR *Eng*^{+/-} respecto a la expresión en los *Eng*^{+/+}, así como la disminución de la expresión de esta enzima en los fibroblastos transfectados con endogлина humana respecto a los controles, representa una situación diametralmente opuesta a la observada en las células endoteliales. Este hallazgo concuerda con la hipótesis previamente expuesta en los estudios *in vivo*. Es posible que el retraso en la cicatrización que presentan los animales *Eng*^{+/-} sea debida a un exceso en la producción de NO en las heridas de estos animales. Este exceso de NO puede estar causado por el aumento en los niveles de eNOS en los fibroblastos, células mayoritarias en la herida.

Una vez obtenidos los fibroblastos de piel, confirmada la haploinsuficiencia de endogлина en los cultivos *Eng*^{+/-} y demostrada la relación inversa que existe entre expresión de endogлина y expresión de eNOS en estas células, nos propusimos estudiar su proliferación, migración y producción de matriz para ver si la haploinsuficiencia de endogлина regula estas propiedades. La proliferación, migración, y producción de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular por parte de los fibroblastos son fundamentales en la fase proliferativa de la cicatrización.

22. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la proliferación de los FPR

El efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la proliferación celular de los FPR se determinó mediante la técnica colorimétrica de tinción de núcleos con cristal violeta.

Con esta técnica, determinamos el incremento en el número de células durante ocho días. Obtuvimos curvas de proliferación diferentes para los FPR *Eng*^{+/+} y los FPR *Eng*^{+/-}. Partiendo del mismo número de células, el número de fibroblastos *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} era todavía similar a los dos días del estudio. Sin embargo, a partir de ese momento los FPR *Eng*^{+/-} proliferaron a mayor ritmo que los *Eng*^{+/+}. La mayor diferencia en número de células la encontramos al octavo día: 32358 ± 873 FPR *Eng*^{+/+} frente a los 39324 ± 182 FPR *Eng*^{+/-} (Figura 45).

Además, realizamos un análisis del ciclo celular de los fibroblastos mediante citometría de flujo. El número de células que se encontraban en las fases S+G2M era ligeramente mayor en los FPR *Eng*^{+/-} ($46 \pm 0.4\%$) que en los *Eng*^{+/+} ($43 \pm 0.9\%$), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa

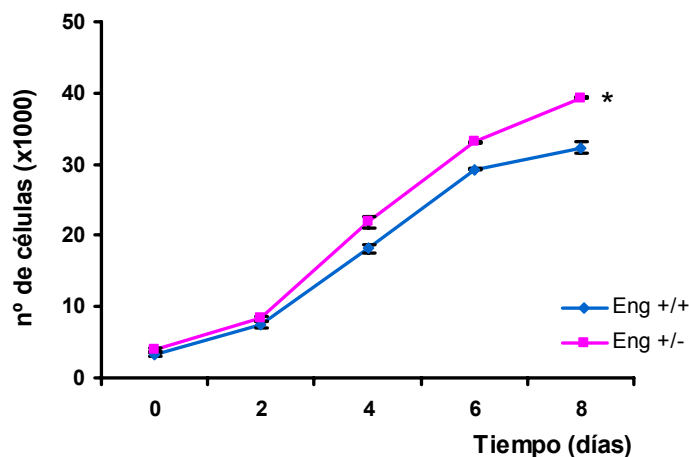


Figura 45. Curvas de proliferación de los FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM, SBF 10%. Se sembraron 5000 FPR en cada pocillo y a las 24 horas (tiempo 0) y 2, 4, 6 y 8 días los núcleos de las células se tiñeron con cristal violeta. La absorbancia se midió espectrofotométricamente y se comparó con una curva absorbancia-nº de células previamente elaborada. El experimento se repitió dos veces obteniéndose similares resultados. Los datos se expresan como la media \pm EEM (n=4 pocillos). Diferencias estadísticas significativas según el test de Bonferroni: *p<0.01 vs curva FPR *Eng*^{+/+}.

A la vista de estos datos podemos afirmar que la haploinsuficiencia de endoglina produce un aumento en la proliferación de los FPR.

Rokhlin y cols. (1995) realizaron un estudio en células estromales derivadas de médula ósea que concuerda con nuestros resultados de proliferación fibroblástica. En este estudio se demuestra que las células estromales responden con un aumento en la proliferación cuando se las incubaba con anticuerpos anti-endoglina.

Hay que recordar en este punto que tanto en las MAEC como en otras células endoteliales (Lebrin y cols., 2004) el efecto de endogлина en la proliferación es contrario a lo que ocurre con los fibroblastos de piel. Esta diferencia en la respuesta celular podría deberse a un efecto célula-dependiente de la expresión de endogлина o bien a que la expresión de endogлина en las células endoteliales sea muy superior a la de los fibroblastos, y como consecuencia de ello los efectos sobre la proliferación celular sean diferentes. También podría explicarse por el hecho de que los FPR *Eng*^{+/-} expresan más eNOS que los *Eng*^{+/+}, pues se sabe que eNOS (u NO) tiene un efecto beneficioso sobre la proliferación celular (Ziche y cols., 1994; López-Rivera y cols., en prensa).

23. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la migración de los FPR

Estudiamos el efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la migración de los FPR mediante la técnica de reparación de “heridas” en la monocapa celular. Como ya hemos explicado anteriormente, esta técnica consiste en levantar las células en determinadas zonas de las placas confluentes y estudiar la migración celular hacia las zonas dañadas.

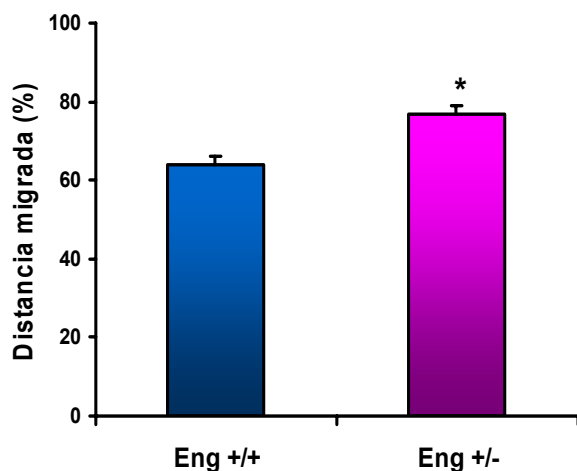


Figura 46. Migración de los FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} hacia zonas sin células de la monocapa. Medio de cultivo DMEM, SBF 10%. Las células se depleccionaron con DMEM, SBF 2%. A las dieciséis horas se realizaron las “heridas” en la monocapa con una punta de pipeta. Veinticuatro horas después se analizó la migración celular. La gráfica representa la cuantificación de la distancia migrada (diferencia entre la distancia inicial sin células y la distancia a las veinticuatro horas). Los datos, obtenidos en dos experimentos diferentes, se expresan como la media ± EEM (n=96). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: *p<0.01 vs FPR *Eng*^{+/+}.

Cuando cuantificamos la distancia migrada a las veinticuatro horas de realizar las “heridas”, encontramos que los FPR *Eng*^{+/-} habían ocupado un $77 \pm 2\%$ de la herida inicial, mientras que los *Eng*^{+/+} solamente habían ocupado el $64 \pm 2\%$ (Figura 46).

Según estos resultados, la haploinsuficiencia de endogлина aumenta la capacidad de migración de los FPR.

Otros grupos de investigación han realizado estudios que implican a endogлина en el control de la migración celular en vasos dañados y durante el desarrollo embrionario (Conley y cols., 2000; Ma y cols., 2000; Liu y cols., 2002). Estos estudios establecen una relación entre la expresión de endogлина y la inhibición de la migración celular en algunos tipos celulares como las células de músculo liso vascular. Concretamente en una línea celular de fibroblastos de ratón transfectados con endogлина, Guerrero-Esteo y cols. (1999), demostraron que la sobreexpresión de endogлина inhibe la migración celular. Estos datos concuerdan con nuestros experimentos de migración en FPR *Eng*^{+/-} y son opuestos a lo observado en las células endoteliales *Eng*^{+/-}, que presentan menor capacidad de migración que las *Eng*^{+/+}. Esto demuestra que el efecto de la expresión de endogлина sobre funciones biológicas como la proliferación y la migración puede ser dependiente del tipo celular.

24. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la acumulación de matriz extracelular en los FPR

La producción por parte de los fibroblastos de componentes de la matriz extracelular es fundamental en los procesos de reparación. Por otra parte, existen trabajos que demuestran la regulación de la deposición de matriz extracelular por endogлина. Algunos de estos trabajos muestran como la expresión de endogлина reduce la producción de componentes de la matriz en algunos tipos celulares (Lastres y cols. 1996; Obreo y cols., 2004).

Para estudiar como afecta la haploinsuficiencia de endogлина a la síntesis de matriz por parte de los fibroblastos, decidimos analizar mediante Western blot la producción de fibronectina y colágeno I.

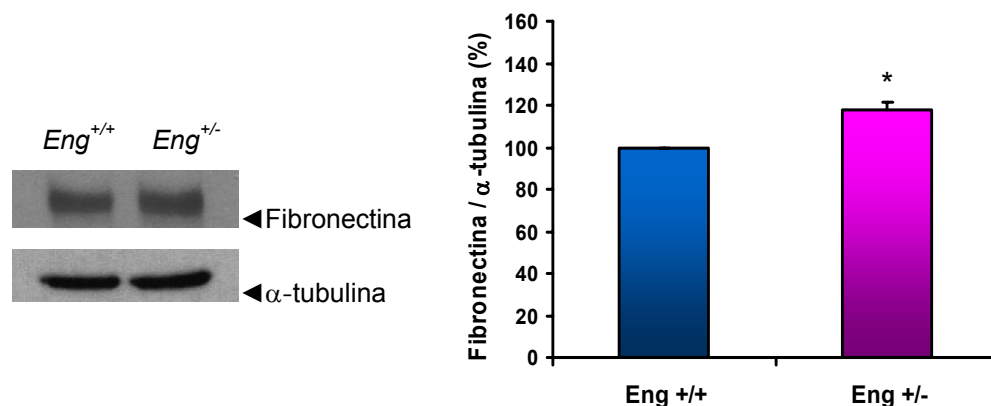


Figura 47. Expresión de fibronectina en lisados de FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando un AcP de conejo anti-fibronectina de ratón. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. Los datos, obtenidos en cuatro experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=4). Diferencias estadísticas significativas según el test *t* de Student: **p*<0.01 vs FPR *Eng*^{+/+}.

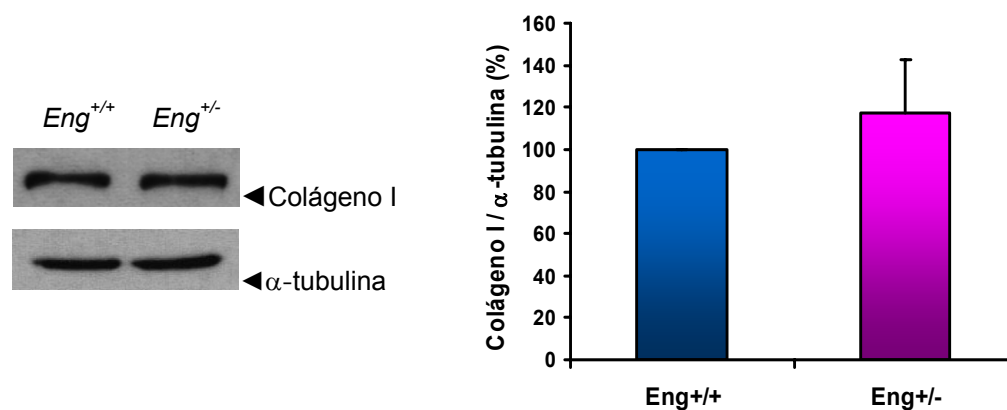


Figura 48. Expresión de colágeno I en lisados de FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando un AcP de conejo anti-colágeno I de ratón. Se usó como control interno de carga la expresión de α -tubulina. Los datos, obtenidos en tres experimentos diferentes, se expresan como la media \pm EEM (n=3).

Los niveles de fibronectina fueron significativamente mayores (aproximadamente un 18%) en los FPR *Eng*^{+/-} que en los *Eng*^{+/+} (Figura 47). Sin embargo, los niveles de colágeno I encontrados en los FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} no fueron estadísticamente diferentes (Figura 48).

También en el caso de los FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-} analizamos mediante Western blot la expresión de CTGF, por la relevancia de esta citoquina en la deposición de matriz extracelular (Mori y cols., 1999).

A diferencia de lo que ocurre en el caso de las células endoteliales, así como con otros tipos celulares (Obreo y cols., 2004), no encontramos diferencias en la expresión de CTGF entre los FPR haploinsuficientes en endogлина y sus controles (Figura 49).

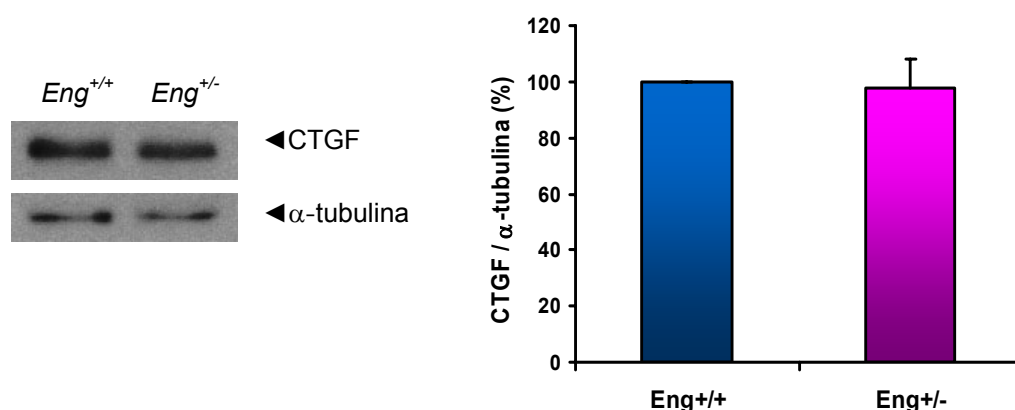


Figura 49. Expresión de CTGF en lisados de FPR *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. Medio de cultivo: DMEM, SBF 10%. La determinación se realizó mediante Western blot utilizando un AcP de cabra anti-CTGF. Se usó como control interno de carga la expresión de α-tubulina. Los datos, obtenidos en cuatro experimentos diferentes, se expresan como la media ± EEM (n=4).

El CTGF no se expresa normalmente en los fibroblastos, pero sí en presencia de TGF-β1. Grotendorst y cols. (2004) propusieron que las respuestas biológicas de los fibroblastos a TGF-β1 (proliferación, diferenciación en miofibroblastos, síntesis de colágeno) están reguladas por una vía dependiente de CTGF, en concierto con otras vías. Shi-wen y cols. (2000) evidenciaron el papel potencial del CTGF en la fibrosis patológica demostrando su sobreexpresión en fibroblastos humanos obtenidos de

áreas lesionadas de pacientes con escleroderma. Además, Leask y cols. (2002) propusieron que el aumento de la expresión de endogлина en estos fibroblastos puede suprimir la capacidad de TGF- β de inducir el promotor de CTGF.

A pesar del pequeño aumento en la expresión de fibronectina encontrado en los FPR *Eng*^{+/-} con respecto a los *Eng*^{+/+}, no parece que la endogлина regule la deposición de matriz extracelular en estas células como lo hace en las CEAR y en otros tipos celulares estudiados tanto en nuestro laboratorio como en otros grupos (Lastres y cols., 1996; Letamendía y cols., 1998 b; Obreo y cols., 2004; Chen y cols., 2004).

25. Resumen de los estudios de cicatrización *in vivo* e *in vitro*

Nuestros resultados demuestran que existe un retraso en la cicatrización de las heridas en los animales *Eng*^{+/-} con respecto a los animales *Eng*^{+/+}. La diferencia en la cicatrización entre unos y otros animales es más notable en los primeros días tras realizar las heridas.

La inhibición de la síntesis de NO no afectó a la cicatrización de los animales *Eng*^{+/+}, mientras que favoreció considerablemente la de los *Eng*^{+/-}. Esto indica que el retraso en la cicatrización en los animales haploinsuficientes puede deberse a un exceso en la producción de NO. El aumento de la liberación de NO en las heridas de los animales *Eng*^{+/-} podría estar causado por el aumento en la expresión de eNOS en los fibroblastos provenientes de la piel de estos animales. Estas células son mayoritarias en la herida durante la fase proliferativa de la cicatrización.

Por otro lado, hemos comprobado que la expresión de endoglina regula algunas de las propiedades biológicas de los fibroblastos de piel involucradas en los procesos de cicatrización. Según nuestros experimentos los fibroblastos procedentes de animales haploinsuficientes migran y proliferan más rápido que los procedentes de animales control, lo que podría deberse a una mayor concentración de NO en las células haploinsuficientes. El aumento de la proliferación y migración asociado a la mayor producción de NO ya ha sido demostrado en otros tipos celulares. La mayor o menor expresión de endoglina no parece regular en estas células la producción de componentes de la matriz extracelular, como lo hace en las CEAR así como en otros tipos celulares. La producción de matriz por parte de los fibroblastos es fundamental en los procesos de reparación.

Por tanto, el hecho de que la cicatrización de heridas cutáneas sea más rápida en los animales *Eng*^{+/+} que en los *Eng*^{+/-} no parece estar causada por una regulación diferente de la producción de componentes de la matriz por parte de los fibroblastos de piel de unos y otros animales. En principio tampoco parece que estén involucradas la proliferación y migración fibroblástica en las heridas de los animales. Sin embargo es

posible que la mayor capacidad de proliferación y migración de los fibroblastos procedentes de animales haploinsuficientes, pueda incluso interferir en la cicatrización tisular. Los procesos de reparación conllevan una serie de eventos integrados que se deben desarrollar de manera adecuada tanto espacial como temporalmente para que la cicatrización del tejido se desarrolle correctamente. Es posible que en las heridas de los animales *Eng*^{+/-} la proliferación y migración fibroblástica se produzca excesivamente o a destiempo, hecho que podría repercutir negativamente en la cicatrización.

Así mismo, el retraso en la cicatrización que presentan los animales haploinsuficientes de endogлина podría ser debido en parte a las diferencias en la angiogénesis que existen entre los animales *Eng*^{+/+} y *Eng*^{+/-}. En los animales haploinsuficientes también podría estar dañada la transmigración de leucocitos, la cual es fundamental en las primeras fases de la reparación, por lo que la cicatrización se podría ver también afectada por este hecho.

La meta es partir

Giuseppe Ungaretti (1888-1970)

CONCLUSIONES

En base a los resultados expuestos en este trabajo, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1. La endoglina regula la angiogénesis en el individuo adulto.
2. La deficiencia en la angiogénesis asociada a la deficiencia en endoglina puede estar causada por la menor disponibilidad de óxido nítrico en los animales haploinsuficientes, debida a la expresión reducida de eNOS en estos animales.
3. La expresión de endoglina regula algunas de las propiedades biológicas de las células endoteliales involucradas en la angiogénesis, como son la proliferación, la migración y la producción de matriz extracelular.
4. La endoglina regula el proceso de cicatrización de heridas.
5. El retraso en la cicatrización asociado a la deficiencia en endoglina podría estar causado por un exceso de NO en las heridas, producido por la mayor expresión de eNOS en los fibroblastos presentes en las heridas de los animales haploinsuficientes.
6. La haploinsuficiencia de endoglina aumenta la capacidad de proliferación y migración de los fibroblastos de piel. La producción de componentes de la matriz extracelular no parece estar regulada por la expresión de endoglina en estas células.

*No pido otra cosa:
el cielo sobre mí,
y el camino bajo mis pies*

Robert Louis Stevenson (1850-1894)

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, P.J., Clesham, G.J. y Weissberg, P.L. (1998) Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 247, 33-37.
- Alarcon, R., Koumenis, C., Geyer, R.K., Maki, C.G. y Giaccia, A.J. (1999) Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer Res*, 59, 6046-6051.
- Albina, J.E., Mills, C.D., Henry, W.L., Jr. y Caldwell, M.D. (1990) Temporal expression of different pathways of L-arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol*, 144, 3877-3880.
- Altomonte, M., Montagner, R., Fonsatti, E., Colizzi, F., Cattarossi, I., Brasoveanu, L.I., Nicotra, M.R., Cattelan, A., Natali, P.G. y Maio, M. (1996) Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. *Br J Cancer*, 74, 1586-1591.
- Anggard, E. (1994) Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*, 343, 1199-1206.
- Arthur, H.M., Ure, J., Smith, A.J., Renforth, G., Wilson, D.I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D.V., Jowett, T., Marchuk, D.A., Burn, J. y Diamond, A.G. (2000) Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol*, 217, 42-53.
- Assoian, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.C., Miller, P.J., Madtes, D.K., Raines, E.W., Ross, R. y Sporn, M.B. (1987) Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 6020-6024.
- Attisano, L. y Wrana, J.L. (1998) Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 10, 188-194.
- Attisano, L. y Wrana, J.L. (2000) Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 235-243.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, P.P., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1987) *Current Protocols in molecular biology* (New York: John Wiley&Sons).
- Bachetti, T. y Morbidelli, L. (2000) Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res*, 42, 9-19.
- Barbara, N.P., Wrana, J.L. y Letarte, M. (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*, 274, 584-594.
- Barbul, A., Lazarou, S.A., Efron, D.T., Wasserkrug, H.L. y Efron, G. (1990)

- Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery*, 108, 331-336.
- Barcellos-Hoff, M.H. (1996) Latency and activation in the control of TGF-beta. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1, 353-363.
- Barillari, G. y Ensoli, B. (2002) Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Clin Microbiol Rev*, 15, 310-326.
- Beanes, S.R., Dang, C., Soo, C. y Ting, K. (2003) Skin repair and scar formation: the central role of TGF. *Expert Rev Mol Med*, 2003, 1-22.
- Beckman, J.S. y Koppenol, W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-1437.
- Bellón, T., Corbi, A., Lastres, P., Cales, C., Cebrian, M., Vera, S., Cheifetz, S., Massagué, J., Letarte, M. y Bernabéu, C. (1993) Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol*, 23, 2340-2345.
- Benjamin, L.E., Hemo, I. y Keshet, E. (1998) A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*, 125, 1591-1598.
- Black, C.M. (1993) The aetiopathogenesis of systemic sclerosis. *J Intern Med*, 234, 3-8.
- Blanco, F.J., Santibáñez, J.F., Guerrero-Esteo, M., Langa, C., Vary, C.P. y Bernabéu, C. (2005) Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* (artículo online).
- Bloch, W., Huggel, K., Sasaki, T., Grose, R., Bugnon, P., Addicks, K., Timpl, R. y Werner, S. (2000) The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *Faseb J*, 14, 2373-2376.
- Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S.E. y Kaiser, H.E. (1998) Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. *Anticancer Res*, 18, 2701-2710.
- Botella, L.M., Sánchez-Elsner, T., Rius, C., Corbi, A. y Bernabéu, C. (2001) Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem*, 276, 34486-34494.

- Boudier, H.A. (1999) Arteriolar and capillary remodelling in hypertension. *Drugs*, 58 Spec No 1, 37-40.
- Bourdeau, A., Cymerman, U., Paquet, M.E., Meschino, W., McKinnon, W.C., Guttmacher, A.E., Becker, L. y Letarte, M. (2000) Endoglin expression is reduced in normal vessels but still detectable in arteriovenous malformations of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Am J Pathol*, 156, 911-923. (a)
- Bourdeau, A., Dumont, D.J. y Letarte, M. (1999) A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*, 104, 1343-1351.
- Bourdeau, A., Faughnan, M.E. y Letarte, M. (2000) Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med*, 10, 279-285. (b)
- Bradshaw, A.D., Francki, A., Motamed, K., Howe, C. y Sage, E.H. (1999) Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Mol Biol Cell*, 10, 1569-1579.
- Braverman, I.M., Keh, A. y Jacobson, B.S. (1990) Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol*, 95, 422-427.
- Brown, E.J. (1995) Phagocytosis. *Bioessays*, 17, 109-117.
- Brown, K.J., Maynes, S.F., Bezos, A., Maguire, D.J., Ford, M.D. y Parish, C.R. (1996) A novel in vitro assay for human angiogenesis. *Lab Invest*, 75, 539-555.
- Bulgrin, J. P., Shabani, M., Chakravarthy, D. y Smith, D. J. (1995) Nitric oxide synthesis is suppressed in steroid-impaired and diabetic wounds. *Wounds*, 7, 48-57.
- Burrows, F.J., Derbyshire, E.J., Tazzari, P.L., Amlot, P., Gazdar, A.F., King, S.W., Letarte, M., Vitetta, E.S. y Thorpe, P.E. (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*, 1, 1623-1634.
- Calabro, L., Fonsatti, E., Bellomo, G., Alonci, A., Colizzi, F., Sigalotti, L., Altomonte, M., Musolino, C. y Maio, M. (2003) Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol*, 194, 171-175.
- Carmeliet, P. (2001) Biomedicine. Clotting factors build blood vessels. *Science*, 293, 1602-1604.
- Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9, 653-660.

- Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oostuyse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M.C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.M., Collen, D. y Dejana, E. (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 98, 147-157.
- Chang, E., Yang, J., Nagavarapu, U. y Herron, G.S. (2002) Aging and survival of cutaneous microvasculature. *J Invest Dermatol*, 118, 752-758.
- Chatani, Y., Tanimura, S., Miyoshi, N., Hattori, A., Sato, M. y Kohno, M. (1995) Cell type-specific modulation of cell growth by transforming growth factor beta 1 does not correlate with mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, 270, 30686-30692.
- Cheifetz, S., Bellón, T., Cales, C., Vera, S., Bernabéu, C., Massagué, J. y Letarte, M. (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 267, 19027-19030.
- Chen, K., Mehta, J.L., Li, D., Joseph, L. y Joseph, J. (2004) Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res*, 95, 1167-1173.
- Cho, C.H. (2001) Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *J Physiol Paris*, 95, 253-256.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Christian, J.L. y Nakayama, T. (1999) Can't get no SMADisfaction: Smad proteins as positive and negative regulators of TGF-beta family signals. *Bioessays*, 21, 382-390.
- Cohen, R.A., Plane, F., Najibi, S., Huk, I., Malinski, T. y Garland, C.J. (1997) Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4193-4198.
- Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., Plaisance, S., Dor, Y., Keshet, E., Lupu, F., Nemery, B., Dewerchin, M., Van Veldhoven, P., Plate, K., Moons, L., Collen, D. y Carmeliet, P. (2002) Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*, 8, 702-710.

- Conley, B.A., Koleva, R., Smith, J.D., Kacer, D., Zhang, D., Bernabeu, C. y Vary, C.P. (2004) Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem*, 279, 27440-27449.
- Conley, B.A., Smith, J.D., Guerrero-Esteo, M., Bernabéu, C. y Vary, C.P. (2000) Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 153, 323-335.
- Conway, E.M., Collen, D. y Carmeliet, P. (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*, 49, 507-521.
- Couffinhal, T., Silver, M., Zheng, L.P., Kearney, M., Witzembichler, B. y Isner, J.M. (1998) Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*, 152, 1667-1679.
- Coussens, L.M. y Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-867.
- de la Torre, J.C. (2002) Alzheimer's disease: how does it start? *J Alzheimers Dis*, 4, 497-512.
- Derynck, R. y Feng, X.H. (1997) TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1333, F105-150.
- Derynck, R. y Zhang, Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425, 577-584.
- Dharmapatni, A.A., Smith, M.D., Ahern, M.J., Simpson, A., Li, C., Kumar, S. y Roberts-Thomson, P.J. (2001) The TGF beta receptor endoglin in systemic sclerosis. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 19, 275-282.
- Díez-Marques, L., Ortega-Velázquez, R., Langa, C., Rodríguez-Barbero, A., López-Novoa, J.M., Lamas, S. y Bernabéu, C. (2002) Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1587, 36-44.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. y Zeiher, A.M. (1997) Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med*, 185, 601-607.
- Dong, Q.G., Bernasconi, S., Lostaglio, S., De Calmanovici, R.W., Martin-Padura, I., Breviario, F., Garlanda, C., Ramponi, S., Mantovani, A. y Vecchi, A. (1997) A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 1599-1604.
- Dor, Y., Djonov, V., Abramovitch, R., Itin, A., Fishman, G.I., Carmeliet, P., Goelman, G. y Keshet, E. (2002) Conditional switching of VEGF

- provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *Embo J*, 21, 1939-1947.
- Drysdale, B.E., Zacharchuk, C.M. y Shin, H.S. (1983) Mechanism of macrophage-mediated cytotoxicity: production of a soluble cytotoxic factor. *J Immunol*, 131, 2362-2367.
- Duff, S.E., Li, C., Garland, J.M. y Kumar, S. (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *Faseb J*, 17, 984-992.
- Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M. y Dvorak, A.M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, 146, 1029-1039.
- Eady, R.A.J., Leigh, I.M. y Pope, F.M. (1998) Epidermis. En: Textbook of dermatology (Eds. Champion R.H., Burton, J.L., Burns, P.A., Breathnach, S.M. Blackwell Science Ltd, Reino Unido), págs. 43-59.
- Eliceiri, B.P. y Cheresh, D.A. (2001) Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 563-568.
- English, D., Brindley, D.N., Spiegel, S. y García, J.G. (2002) Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 228-239.
- Fernández-Ruiz, E., St-Jacques, S., Bellón, T., Letarte, M. y Bernabéu, C. (1993) Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet*, 64, 204-207.
- Ferrara, N. y Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18, 4-25.
- Ferrara, N., Gerber, H.P. y LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-676.
- Ferrara, N. y Henzel, W.J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161, 851-858.
- Ferrara, N. y Keyt, B. (1997) Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *Exs*, 79, 209-232.
- Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285, 1182-1186.
- Folkman, J. (1993) Regulation of angiogenesis. *Blood*, 82, 60.
- Folkman, J. (1997) Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *Exs*, 79, 1-8.
- Folkman, J. y D'Amore, P.A. (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, 87, 1153-1155.

- Folkman, J. y Shing, Y. (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267, 10931-10934.
- Fonsatti, E., Jekunen, A.P., Kairemo, K.J., Coral, S., Snellman, M., Nicotra, M.R., Natali, P.G., Altomonte, M. y Maio, M. (2000) Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res*, 6, 2037-2043.
- Fonsatti, E., Del Vecchio, L., Altomonte, M., Sigalotti, L., Nicotra, M.R., Coral, S., Natali, P.G. y Maio, M. (2001) Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol*, 188, 1-7.
- Form, D.M., Pratt, B.M. y Madri, J.A. (1986) Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components. *Lab Invest*, 55, 521-530.
- Furchgott, R.F. y Zawadzki, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-376.
- Gale, N.W., Thurston, G., Hackett, S.F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M.H., Jackson, D., Suri, C., Campochiaro, P.A., Wiegand, S.J. y Yancopoulos, G.D. (2002) Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell*, 3, 411-423.
- Gallione, C.J., Klaus, D.J., Yeh, E.Y., Stenzel, T.T., Xue, Y., Anthony, K.B., McAllister, K.A., Baldwin, M.A., Berg, J.N., Lux, A., Smith, J.D., Vary, C.P., Craigen, W.J., Westermann, C.J., Warner, M.L., Miller, Y.E., Jackson, C.E., Guttmacher, A.E. y Marchuk, D.A. (1998) Mutation and expression analysis of the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia reveals null alleles. *Hum Mutat*, 11, 286-294.
- Gardner, H.A. (1999) Integrin signaling in fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep*, 1, 28-33.
- Garlanda, C. y Dejana, E. (1997) Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 1193-1202.
- Garrington, T.P. y Johnson, G.L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 211-218.
- Ge, A.Z. y Butcher, E.C. (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF-beta ligand. *Gene*, 138, 201-206.

- Gennaro, G., Menard, C., Michaud, S.E. y Rivard, A. (2003) Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation*, 107, 230-233.
- Gerber, H.P., Dixit, V. y Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 273, 13313-13316. (a)
- Gerber, H.P., Hillan, K.J., Ryan, A.M., Kowalski, J., Keller, G.A., Rangell, L., Wright, B.D., Radtke, F., Aguet, M. y Ferrara, N. (1999) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 126, 1149-1159.
- Gerber, H.P., Malik, A.K., Solar, G.P., Sherman, D., Liang, X.H., Meng, G., Hong, K., Marsters, J.C. y Ferrara, N. (2002) VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*, 417, 954-958.
- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V. y Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 273, 30336-30343. (b)
- Gleizes, P.E., Noaillac-Depeyre, J., Amalric, F. y Gas, N. (1995) Basic fibroblast growth factor (FGF-2) internalization through the heparan sulfate proteoglycans-mediated pathway: an ultrastructural approach. *Eur J Cell Biol*, 66, 47-59.
- Gómez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. y Thorgeirsson, U.P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74, 111-122.
- Gougos, A. y Letarte, M. (1988) Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol*, 141, 1925-1933. (a)
- Gougos, A. y Letarte, M. (1988) Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol*, 141, 1934-1940. (b)
- Gougos, A. y Letarte, M. (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*, 265, 8361-8364.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. y ten Dijke, P. (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J*, 21, 1743-1753.
- Grainger, D.J., Mosedale, D.E. y Metcalfe, J.C. (2000) TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11, 133-145.

- Graulich, W., Nettelbeck, D.M., Fischer, D., Kissel, T. y Muller, R. (1999) Cell type specificity of the human endoglin promoter. *Gene*, 227, 55-62.
- Griess, P. (1879) Bermerkungen zu der Abhandlung de HH. Welselsky und Benedikt Veber einige Azoverbindungen Ber Deutsch. *Chem Ges*, 12, 426-429.
- Griffioen, A.W. y Molema, G. (2000) Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*, 52, 237-268.
- Grotendorst, G.R., Rahmanie, H. y Duncan, M.R. (2004) Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J*, 18, 469-479.
- Grugel, S., Finkenzeller, G., Weindel, K., Barleon, B. y Marme, D. (1995) Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem*, 270, 25915-25919.
- Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendía, A., Pérez-Álvarez, M.J., Langa, C., López, L.A., Fabra, A., García-Pardo, A., Vera, S., Letarte, M. y Bernabéu, C. (1999) Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, 78, 614-623.
- Guerrero-Esteo, M., Sánchez-Elsner, T., Letamendía, A. y Bernabéu, C. (2002) Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem*, 277, 29197-29209.
- Guo, B., Slevin, M., Li, C., Parameshwar, S., Liu, D., Kumar, P., Bernabéu, C. y Kumar, S. (2004) CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling. *Anticancer Res*, 24, 1337-1345.
- Guttmacher, A.E., Marchuk, D.A. y White, R.I., Jr. (1995) Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*, 333, 918-924.
- Hackett, S.F., Wiegand, S., Yancopoulos, G. y Campochiaro, P.A. (2002) Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *J Cell Physiol*, 192, 182-187.
- Hangai, M., Kitaya, N., Xu, J., Chan, C.K., Kim, J.J., Werb, Z., Ryan, S.J. y Brooks, P.C. (2002) Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am J Pathol*, 161, 1429-1437.
- Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T. y Miyazono, K. (2001) The N domain of Smad7 is essential for specific

- inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol*, 155, 1017-1027.
- Harada, K., Lu, S., Chisholm, D.M., Syrjanen, S. y Schor, A.M. (2000) Angiogenesis and vasodilation in skin warts. Association with HPV infection. *Anticancer Res*, 20, 4519-4523.
- Hartsough, M.T. y Mulder, K.M. (1997) Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. *Pharmacol Ther*, 75, 21-41.
- Haruta, Y. y Seon, B.K. (1986) Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 7898-7902.
- Hattori, K., Dias, S., Heissig, B., Hackett, N.R., Lyden, D., Tateno, M., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Witte, L., Crystal, R.G., Moore, M.A. y Rafii, S. (2001) Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 193, 1005-1014.
- Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Bohlen, P., Witte, L., Hendrikx, J., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Moore, M.A., Werb, Z., Lyden, D. y Rafii, S. (2002) Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med*, 8, 841-849.
- Heil, M., Ziegelhoeffer, T., Pipp, F., Kostin, S., Martin, S., Clauss, M. y Schaper, W. (2002) Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H2411-2419.
- Heldin, C.H., Miyazono, K. y ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390, 465-471.
- Helisch, A. y Schaper, W. (2003) Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation*, 10, 83-97.
- Hellstrom, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H. y Betsholtz, C. (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*, 153, 543-553.
- Hershey, J.C., Baskin, E.P., Glass, J.D., Hartman, H.A., Gilberto, D.B., Rogers, I.T. y Cook, J.J. (2001) Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res*, 49, 618-625.
- Hewett, P., Nijjar, S., Shams, M., Morgan, S., Gupta, J. y Ahmed, A. (2002) Down-regulation of angiopoietin-1 expression in menorrhagia. *Am J Pathol*, 160, 773-780.

- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boly, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D. y Wiegand, S.J. (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 284, 1994-1998.
- Hood, J.D., Meininger, C.J., Ziche, M. y Granger, H.J. (1998) VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol*, 274, H1054-1058.
- Hubner, G., Brauchle, M., Smola, H., Madlener, M., Fassler, R. y Werner, S. (1996) Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokine*, 8, 548-556.
- Humbert, M. y Trembath, R.C. (2002) Genetics of pulmonary hypertension: from bench to bedside. *Eur Respir J*, 20, 741-749.
- Hynes, R.O. (2002) A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med*, 8, 918-921.
- Ignarro, L.J. (1996) Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl*, 55, S2-5.
- Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M. y Wood, K.S. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, 61, 866-879.
- Ignarro, L.J., Lippton, H., Edwards, J.C., Baricos, W.H., Hyman, A.L., Kadowitz, P.J. y Gruetter, C.A. (1981) Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*, 218, 739-749.
- Ingber, D.E. y Folkman, J. (1989) Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol*, 109, 317-330.
- Inoki, I., Shiomi, T., Hashimoto, G., Enomoto, H., Nakamura, H., Makino, K., Ikeda, E., Takata, S., Kobayashi, K. y Okada, Y. (2002) Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *Faseb J*, 16, 219-221.
- Íñiguez, M.A., Rodríguez, A., Volpert, O.V., Fresno, M. y Redondo, J.M. (2003) Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med*, 9, 73-78.
- Ito, W.D., Arras, M., Scholz, D., Winkler, B., Htun, P. y Schaper, W. (1997) Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*, 273, H1255-1265.

- Jackson, C. (2002) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 11, 295-299.
- Jain, R.K. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*, 9, 685-693.
- Jain, R.K. y Munn, L.L. (2000) Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med*, 6, 131-132.
- Jenkinson, L., Bardhan, K.D., Atherton, J. y Kalia, N. (2002) Helicobacter pylori prevents proliferative stage of angiogenesis in vitro: role of cytokines. *Dig Dis Sci*, 47, 1857-1862.
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J.V., Prieto, M., Carrón, R., Sanz-Rodríguez, F., Pérez-Barriocanal, F., Rodríguez-Barbero, A., Bernabéu, C. y López-Novoa, J.M. (2004) Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J*, 18, 609-611.
- Johnson, D.W., Berg, J.N., Baldwin, M.A., Gallione, C.J., Marondel, I., Yoon, S.J., Stenzel, T.T., Speer, M., Pericak-Vance, M.A., Diamond, A., Guttmacher, A.E., Jackson, C.E., Attisano, L., Kucherlapati, R., Porteous, M.E. y Marchuk, D.A. (1996) Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet*, 13, 189-195.
- Kalluri, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 3, 422-433.
- Kanda, S., Landgren, E., Ljungstrom, M. y Claesson-Welsh, L. (1996) Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice. *Cell Growth Differ*, 7, 383-395.
- Kang, D.H., Anderson, S., Kim, Y.G., Mazzalli, M., Suga, S., Jefferson, J.A., Gordon, K.L., Oyama, T.T., Hughes, J., Hugo, C., Kerjaschki, D., Schreiner, G.F. y Johnson, R.J. (2001) Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis*, 37, 601-611.
- Karkkainen, M.J., Makinen, T. y Alitalo, K. (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol*, 4, E2-5.
- Kasahara, Y., Tuder, R.M., Taraseviciene-Stewart, L., Le Cras, T.D., Abman, S., Hirth, P.K., Waltenberger, J. y Voelkel, N.F. (2000) Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest*, 106, 1311-1319.
- Katusic, Z.S. (1992) Role of nitric oxide signal transduction pathway in regulation of vascular tone. *Int Angiol*, 11, 14-19.
- Keyt, B.A., Berleau, L.T., Nguyen, H.V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R. y Ferrara, N. (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of

- vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem*, 271, 7788-7795.
- Kirk, S.J., Hurson, M., Regan, M.C., Holt, D.R., Wasserkrug, H.L. y Barbul, A. (1993) Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery*, 114, 155-159; discussion 160.
- Klein, S., Roghani, M. y Rifkin, D.B. (1997) Fibroblast growth factors as angiogenesis factors: new insights into their mechanism of action. *Exs*, 79, 159-192.
- Kluk, M.J. y Hla, T. (2002) Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 72-80.
- Knighton, D.R., Silver, I.A. y Hunt, T.K. (1981) Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery*, 90, 262-270.
- Kofler, S., Nickel, T. y Weis, M. (2004) The role of cytokines in cardiovascular diseases. Focus on endothelial response to inflammation. *Clin Sci (Lond)*.
- Kojda, G., Laursen, J.B., Ramasamy, S., Kent, J.D., Kurz, S., Burchfield, J., Shesely, E.G. y Harrison, D.G. (1999) Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res*, 42, 206-213.
- Koli, K., Saharinen, J., Hyytiainen, M., Penttinen, C. y Keski-Oja, J. (2001) Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc Res Tech*, 52, 354-362.
- Koong, A.C., Chen, E.Y. y Giaccia, A.J. (1994) Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res*, 54, 1425-1430.
- Krupinski, J., Kaluza, J., Kumar, P., Kumar, S. y Wang, J.M. (1994) Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 25, 1794-1798.
- Kruse, A., Hallmann, R. y Butcher, E.C. (1999) Specialized patterns of vascular differentiation antigens in the pregnant mouse uterus and the placenta. *Biol Reprod*, 61, 1393-1401.
- Ku, D.D., Zaleski, J.K., Liu, S. y Brock, T.A. (1993) Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*, 265, H586-592.
- Kumar, S., Ghellal, A., Li, C., Byrne, G., Haboubi, N., Wang, J.M. y Bundred, N. (1999) Breast carcinoma: vascular density determined

- using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*, 59, 856-861.
- Kuzu, I., Bicknell, R., Harris, A.L., Jones, M., Gatter, K.C. y Mason, D.Y. (1992) Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J Clin Pathol*, 45, 143-148.
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A. y Massagué, J. (1996) Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature*, 383, 832-836.
- Lamouille, S., Mallet, C., Feige, J.J. y Bailly, S. (2002) Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood*, 100, 4495-4501.
- Lastres, P., Bellón, T., Cabanas, C., Sánchez-Madrid, F., Acevedo, A., Gougos, A., Letarte, M. y Bernabéu, C. (1992) Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol*, 22, 393-397.
- Lastres, P., Letamendía, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., López, L.A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M. y Bernabéu, C. (1996) Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol*, 133, 1109-1121.
- Lastres, P., Martín-Pérez, J., Langa, C. y Bernabéu, C. (1994) Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J*, 301 (Pt 3), 765-768.
- Lawler, J., Weinstein, R. y Hynes, R.O. (1988) Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol*, 107, 2351-2361.
- Lawson, N.D., Vogel, A.M. y Weinstein, B.M. (2002) sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell*, 3, 127-136.
- Leask, A., Abraham, D.J., Finlay, D.R., Holmes, A., Pennington, D., Shi-Wen, X., Chen, Y., Venstrom, K., Dou, X., Ponticos, M., Black, C., Bernabeu, C., Jackman, J.K., Findell, P.R. y Connolly, M.K. (2002) Dysregulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma: overexpression of endoglin in cutaneous scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 46, 1857-1865.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. y Ten Dijke, P. (2005) TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res*, 65, 599-608.
- Lebrin, F., Goumans, M.J., Jonker, L., Carvalho, R.L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H.M. y ten Dijke, P. (2004) Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *Embo J*, 23, 4018-4028.

- LeCouter, J., Kowalski, J., Foster, J., Hass, P., Zhang, Z., Dillard-Telm, L., Frantz, G., Rangell, L., DeGuzman, L., Keller, G.A., Peale, F., Gurney, A., Hillan, K.J. y Ferrara, N. (2001) Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, 412, 877-884.
- Lee, P.C., Salyapongse, A.N., Bragdon, G.A., Shears, L.L., 2nd, Watkins, S.C., Edington, H.D. y Billiar, T.R. (1999) Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol*, 277, H1600-1608.
- Letamendía, A., Lastres, P., Almendro, N., Raab, U., Buhning, H.J., Kumar, S. y Bernabéu, C. (1998) Endoglin, a component of the TGF-beta receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells. *Int J Cancer*, 76, 541-546. (a)
- Letamendía, A., Lastres, P., Botella, L.M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L. y Bernabéu, C. (1998) Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem*, 273, 33011-33019.(b)
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V. y Ferrara, N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246, 1306-1309.
- Li, C., Guo, B., Bernabéu, C. y Kumar, S. (2001) Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc Res Tech*, 52, 437-449.
- Li, C., Hampson, I.N., Hampson, L., Kumar, P., Bernabéu, C. y Kumar, S. (2000) CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *Faseb J*, 14, 55-64.
- Li, C., Issa, R., Kumar, P., Hampson, I.N., López-Novoa, J.M., Bernabéu, C. y Kumar, S. (2003) CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci*, 116, 2677-2685.
- Li, D., Chen, H. y Mehta, J.L. (2001) Angiotensin II via activation of type 1 receptor upregulates expression of endoglin in human coronary artery endothelial cells. *Hypertension*, 38, 1062-1067.
- Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S., Urness, L.D., Davis, E.C., Taylor, D.G., Boak, B.B. y Wendel, D.P. (1999) Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*, 284, 1534-1537.
- Liekens, S., De Clercq, E. y Neyts, J. (2001) Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 61, 253-270.
- Liu, F. (2003) Receptor-regulated Smads in TGF-beta signaling. *Front Biosci*, 8, s1280-1303.

- Liu, J., Wang, X.B., Park, D.S. y Lisanti, M.P. (2002) Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem*, 277, 10661-10668.
- López-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L. y Massagué, J. (1994) Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol*, 124, 557-568.
- López-Rivera, E., Lizarbe, T.R., López-Novoa, J.M., Rodríguez-Barbero, A., Rodrigo, J., Álvarez-Barrientos, A., Lamas, S. y Zaragoza, C. (En prensa) MMP-13 mediates nitric oxide activation of endothelial cells. *PNAS*.
- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L. y Snyder, S.H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 120, 227-237.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Luttun, A., Carmeliet, G. y Carmeliet, P. (2002) Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med*, 12, 88-96. (a)
- Luttun, A., Dewerchin, M., Collen, D. y Carmeliet, P. (2000) The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep*, 2, 407-416.
- Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J.A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B., Compornolle, V., Daci, E., Bohlen, P., Dewerchin, M., Herbert, J.M., Fava, R., Matthys, P., Carmeliet, G., Collen, D., Dvorak, H.F., Hicklin, D.J. y Carmeliet, P. (2002) Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*, 8, 831-840. (b)
- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., Wu, Y., Hicklin, D., Zhu, Z., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Moore, M.A., Hajjar, K.A., Manova, K., Benezra, R. y Rafii, S. (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*, 7, 1194-1201.
- Ma, X., Labinaz, M., Goldstein, J., Miller, H., Keon, W.J., Letarte, M. y O'Brien, E. (2000) Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 2546-2552.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A. y Poellinger, L. (2001) Inhibitory PAS domain

- protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414, 550-554.
- Malinda, K.M., Sidhu, G.S., Banaudha, K.K., Gaddipati, J.P., Maheshwari, R.K., Goldstein, A.L. y Kleinman, H.K. (1998) Thymosin alpha 1 stimulates endothelial cell migration, angiogenesis, and wound healing. *J Immunol*, 160, 1001-1006.
- Marchuk, D.A. (1998) Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Opin Hematol*, 5, 332-338.
- Marletta, M.A. (1988) Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol*, 1, 249-257.
- Marletta, M.A. (1994) Approaches toward selective inhibition of nitric oxide synthase. *J Med Chem*, 37, 1899-1907.
- Martin, P. (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276, 75-81.
- Martínez, P., Esbrit, P., Rodrigo, A., Álvarez-Arroyo, M.V. y Martínez, M.E. (2002) Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Osteoporos Int*, 13, 874-881.
- Massagué, J. (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 597-641.
- Massagué, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67, 753-791.
- Massagué, J. y Wotton, D. (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J*, 19, 1745-1754.
- Maynard, S.E., Min, J.Y., Merchan, J., Lim, K.H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T.A., Morgan, J.P., Sellke, F.W., Stillman, I.E., Epstein, F.H., Sukhatme, V.P. y Karumanchi, S.A. (2003) Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 111, 649-658.
- McAllister, K.A., Grogg, K.M., Johnson, D.W., Gallione, C.J., Baldwin, M.A., Jackson, C.E., Helmbold, E.A., Markel, D.S., McKinnon, W.C., Murrell, J. y cols. (1994) Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*, 8, 345-351.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H.J. y Dehio, C. (1999) A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2

- (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J*, 18, 363-374.
- Mikkola, H.K. y Orkin, S.H. (2002) The search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res*, 11, 9-17.
- Miller, D.W., Graulich, W., Karges, B., Stahl, S., Ernst, M., Ramaswamy, A., Sedlacek, H.H., Muller, R. y Adamkiewicz, J. (1999) Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer*, 81, 568-572.
- Miyazono, K. (2000) TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11, 15-22.
- Miyazono, K., Ichijo, H. y Heldin, C.H. (1993) Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors*, 8, 11-22.
- Mole, D.R., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. y Ratcliffe, P.J. (2001) Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life*, 52, 43-47.
- Moncada, S. y Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 329, 2002-2012.
- Morbidelli, L., Chang, C.H., Douglas, J.G., Granger, H.J., Ledda, F. y Ziche, M. (1996) Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol*, 270, H411-415.
- Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T. y Takehara, K. (1999) Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol*, 181, 153-159.
- Morita, I. (2002) Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69, 165-175.
- Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J.F., Fishman, M.C., Huang, P.L. e Isner, J.M. (1998) Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*, 101, 2567-2578.
- Nagao, T., Illiano, S. y Vanhoutte, P.M. (1992) Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol*, 263, H1090-1094.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H. y ten Dijke, P. (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, 389, 631-635.

- Namba, T., Koike, H., Murakami, K., Aoki, M., Makino, H., Hashiya, N., Ogihara, T., Kaneda, Y., Kohno, M. y Morishita, R. (2003) Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation*, 108, 2250-2257.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. y Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*, 13, 9-22.
- Nicosia, R.F. y Ottinetti, A. (1990) Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest*, 63, 115-122.
- Noiri, E., Lee, E., Testa, J., Quigley, J., Colflesh, D., Keese, C.R., Giaever, I. y Goligorsky, M.S. (1998) Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol*, 274, C236-244.
- Obreo, J., Díez-Marques, L., Lamas, S., Duwell, A., Eleno, N., Bernabéu, C., Pandiella, A., López-Novoa, J.M. and Rodríguez-Barbero, A. (2004) Endoglin expression regulates basal y TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem*, 14, 301-310.
- Okada, F., Rak, J.W., Croix, B.S., Lieubeau, B., Kaya, M., Roncari, L., Shirasawa, S., Sasazuki, T. y Kerbel, R.S. (1998) Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3609-3614.
- Oosthuysse, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., Theilmeier, G., Dewerchin, M., Laudénbach, V., Vermylen, P., Raat, H., Acker, T., Vleminckx, V., Van Den Bosch, L., Cashman, N., Fujisawa, H., Drost, M.R., Sciot, R., Bruyninckx, F., Hicklin, D.J., Ince, C., Gressens, P., Lupu, F., Plate, K.H., Robberecht, W., Herbert, J.M., Collen, D. y Carmeliet, P. (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*, 28, 131-138.
- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. y Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88, 277-285.
- Palmer, R.M., Ashton, D.S. y Moncada, S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333, 664-666.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G. y Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526.

- Papapetropoulos, A., García-Cardena, G., Madri, J.A. y Sessa, W.C. (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*, 100, 3131-3139.
- Paquet, M.E., Pece-Barbara, N., Vera, S., Cymerman, U., Karabegovic, A., Shovlin, C. y Letarte, M. (2001) Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function. *Hum Mol Genet*, 10, 1347-1357.
- Park, J.E., Keller, G.A. y Ferrara, N. (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 4, 1317-1326.
- Paul, A., Wilson, S., Belham, C.M., Robinson, C.J., Scott, P.H., Gould, G.W. y Plevin, R. (1997) Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal*, 9, 403-410.
- Pece, N., Vera, S., Cymerman, U., White, R.I., Jr., Wrana, J.L. y Letarte, M. (1997) Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J Clin Invest*, 100, 2568-2579.
- Pece-Barbara, N., Cymerman, U., Vera, S., Marchuk, D.A. y Letarte, M. (1999) Expression analysis of four endoglin missense mutations suggests that haploinsufficiency is the predominant mechanism for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Hum Mol Genet*, 8, 2171-2181.
- Pepper, M.S. (1997) Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8, 21-43.
- Pérez-Gómez, E., Eleno, N., López-Novoa, J.M., Ramírez, J.R., Velasco, B., Letarte, M., Bernabéu, C. y Quintanilla, M. (En prensa) Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogen*.
- Plouet, J., Schilling, J. y Gospodarowicz, D. (1989) Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *Embo J*, 8, 3801-3806.
- Pope, F.M. (1998) Dermis. En: Textbook of dermatology (Eds. Champion, R.H. Burton, J.L. Burns, P.A. Breathnach, S.M. Blackwell, Science ltd, Reino Unido), págs. 59-92.
- Poss, W.B., Timmons, O.D., Farrukh, I.S., Hoidal, J.R. y Michael, J.R. (1995) Inhaled nitric oxide prevents the increase in pulmonary vascular permeability caused by hydrogen peroxide. *J Appl Physiol*, 79, 886-891.

- Pugh, C.W. y Ratcliffe, P.J. (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 9, 677-684.
- Qi, J.H., Ebrahim, Q., Moore, N., Murphy, G., Claesson-Welsh, L., Bond, M., Baker, A. y Anand-Apte, B. (2003) A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med*, 9, 407-415.
- Qu, R., Silver, M.M. y Letarte, M. (1998) Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res*, 292, 333-343.
- Quackenbush, E.J., Gougos, A., Baumal, R. y Letarte, M. (1986) Differential localization within human kidney of five membrane proteins expressed on acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol*, 136, 118-124.
- Quackenbush, E.J. y Letarte, M. (1985) Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J Immunol*, 134, 1276-1285.
- Rees, D.D., Palmer, R.M. y Moncada, S. (1989) Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 3375-3378.
- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P.H. y Verfaillie, C.M. (2002) Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 109, 337-346.
- Riser, B.L., Cortes, P., Yee, J., Sharba, A.K., Asano, K., Rodríguez-Barbero, A. y Narins, R.G. (1998) Mechanical strain- and high glucose-induced alterations in mesangial cell collagen metabolism: role of TGF-beta. *J Am Soc Nephrol*, 9, 827-836.
- Rius, C., Smith, J.D., Almendro, N., Langa, C., Botella, L.M., Marchuk, D.A., Vary, C.P. y Bernabéu, C. (1998) Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood*, 92, 4677-4690.
- Roberts, A.B., Sporn, M.B. (1990) The transforming growth factor-beta. Peptide growth factors and their receptors (M.B. Sporn and A.B. Roberts, eds., Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag), págs. 419-472.
- Robinson, M.J. y Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 180-186.
- Robledo, M.M., Hidalgo, A., Lastres, P., Arroyo, A.G., Bernabéu, C., Sánchez-Madrid, F. y Teixido, J. (1996) Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol*, 93, 507-514.

- Rodríguez-Barbero, A., Obreo, J., Eleno, N., Rodríguez-Peña, A., Duwel, A., Jerkic, M., Sánchez-Rodríguez, A., Bernabéu, C. y López-Novoa, J.M. (2001) Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem Biophys Res Commun*, 282, 142-147.
- Rodríguez-Peña, A., Eleno, N., Duwell, A., Arévalo, M., Pérez-Barriocanal, F., Flores, O., Docherty, N., Bernabéu, C., Letarte, M. y López-Novoa, J.M. (2002) Endoglin upregulation during experimental renal interstitial fibrosis in mice. *Hypertension*, 40, 713-720.
- Rodríguez-Peña, A., Prieto, M., Duwel, A., Rivas, J.V., Eleno, N., Pérez-Barriocanal, F., Arévalo, M., Smith, J.D., Vary, C.P., Bernabéu, C. y López-Novoa, J.M. (2001) Up-regulation of endoglin, a TGF-beta-binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrol Dial Transplant*, 16 Suppl 1, 34-39.
- Rokhlin, O.W., Cohen, M.B., Kubagawa, H., Letarte, M. y Cooper, M.D. (1995) Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol*, 154, 4456-4465.
- Roy-Chaudhury, P., Simpson, J.G. y Power, D.A. (1997) Endoglin, a transforming growth factor-beta-binding protein, is upregulated in chronic progressive renal disease. *Exp Nephrol*, 5, 55-60.
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz, C. y Shima, D.T. (2002) Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev*, 16, 2684-2698.
- Rulo, H.F., Westphal, J.R., van de Kerkhof, P.C., de Waal, R.M., van Vlijmen, I.M. y Ruiten, D.J. (1995) Expression of endoglin in psoriatic involved and uninvolved skin. *J Dermatol Sci*, 10, 103-109.
- Ruoslahti, E. y Pierschbacher, M.D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238, 491-497.
- Rupnick, M.A., Panigrahy, D., Zhang, C.Y., Dallabrida, S.M., Lowell, B.B., Langer, R. y Folkman, M.J. (2002) Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10730-10735.
- Sánchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L. y Bernabéu, C. (2001) Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem*, 276, 38527-38535.
- Sánchez-Elsner, T., Botella, L.M., Velasco, B., Langa, C. y Bernabéu, C. (2002) Endoglin expression is regulated by transcriptional

- cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*, 277, 43799-43808.
- Sanz-Rodríguez, F., Guerrero-Esteo, M., Botella, L.M., Banville, D., Vary, C.P. y Bernabéu, C. (2004) Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem*, 279, 32858-32868.
- Satomi, J., Mount, R.J., Toporsian, M., Paterson, A.D., Wallace, M.C., Harrison, R.V. y Letarte, M. (2003) Cerebral vascular abnormalities in a murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Stroke*, 34, 783-789.
- Schaffer, M.R., Tantry, U., Gross, S.S., Wasserburg, H.L. y Barbul, A. (1996) Nitric oxide regulates wound healing. *J Surg Res*, 63, 237-240.
- Schenk, P.W. y Snaar-Jagalska, B.E. (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1449, 1-24.
- Schnaper, H.W., Hayashida, T., Hubchak, S.C. y Poncelet, A.C. (2003) TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284, F243-252.
- Scholz, D., Ito, W., Fleming, I., Deindl, E., Sauer, A., Wiesnet, M., Busse, R., Schaper, J. y Schaper, W. (2000) Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch*, 436, 257-270.
- Schonfeld, C.L. (1996) Hyalocytes inhibit retinal pigment epithelium cell proliferation in vitro. *Ger J Ophthalmol*, 5, 224-228.
- Schwentker, A., Vodovotz, Y., Weller, R. y Billiar, T.R. (2002) Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide*, 7, 1-10.
- Seon, B.K., Matsuno, F., Haruta, Y., Kondo, M. y Barcos, M. (1997) Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. *Clin Cancer Res*, 3, 1031-1044.
- Serra, R. y Moses, H.L. (1996) Tumor suppressor genes in the TGF-beta signaling pathway? *Nat Med*, 2, 390-391.
- Shabani, M., Pulfer, S. K., Bulgrin, J. P. y Smith, D. J. (1996) Enhancement of wound repair with a topically applied nitric oxide-releasing polymer. *Wound Repair Regen*, 4, 353-362.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H. y Sato, M. (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5, 519-524.

- Shi-wen, X., Pennington, D., Holmes, A., Leask, A., Bradham, D., Beauchamp, J.R., Fonseca, C., du Bois, R.M., Martin, G.R., Black, C.M. y Abraham, D.J. (2000) Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Exp Cell Res*, 259, 213-224.
- Shovlin, C.L. (1997) Molecular defects in rare bleeding disorders: hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost*, 78, 145-150.
- Shovlin, C.L., Hughes, J.M., Scott, J., Seidman, C.E. y Seidman, J.G. (1997) Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet*, 61, 68-79.
- Shovlin, C.L. y Letarte, M. (1999) Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax*, 54, 714-729.
- Shulz, R. (1995) La familia de las enzimas sintetizadoras del óxido nítrico. En: La vía L-arginina óxido nítrico: de su descubrimiento a sus aplicaciones clínicas (editor López-Jaramillo, P. Ediciones científicas, Quito), págs. 23-50.
- Simon, A.M. y McWhorter, A.R. (2002) Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Dev Biol*, 251, 206-220.
- Simons, M. y Ware, J.A. (2003) Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 863-871.
- Singer, A.J. y Clark, R.A. (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341, 738-746.
- Sporn, M.B. y Roberts, A.B. (1992) Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol*, 119, 1017-1021.
- Srinivasan, S., Hanes, M.A., Dickens, T., Porteous, M.E., Oh, S.P., Hale, L.P. y Marchuk, D.A. (2003) A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum Mol Genet*, 12, 473-482.
- Stalmans, I., Lambrechts, D., De Smet, F., Jansen, S., Wang, J., Maity, S., Kneer, P., von der Ohe, M., Swillen, A., Maes, C., Gewillig, M., Molin, D.G., Hellings, P., Boetel, T., Haardt, M., Compennolle, V., Dewerchin, M., Plaisance, S., Vlietinck, R., Emanuel, B., Gittenberger-de Groot, A.C., Scambler, P., Morrow, B., Driscoll, D.A., Moons, L., Esguerra, C.V., Carmeliet, G., Behn-Krappa, A., Devriendt, K., Collen, D., Conway, S.J. y Carmeliet, P. (2003) VEGF: a modifier of the del22q11 (DiGeorge) syndrome? *Nat Med*, 9, 173-182.

- Stalmans, I., Ng, Y.S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouche, A., Yuce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., Hicklin, D., Anderson, D.J., Gardiner, T., Hammes, H.P., Moons, L., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P. y D'Amore, P.A. (2002) Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest*, 109, 327-336.
- St-Jacques, S., Cymerman, U., Pece, N. y Letarte, M. (1994) Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology*, 134, 2645-2657.
- Sumpio, B.E., Riley, J.T. y Dardik, A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 34, 1508-1512.
- Szekanecz, Z., Haines, G.K., Harlow, L.A., Shah, M.R., Fong, T.W., Fu, R., Lin, S.J., Rayan, G. y Koch, A.E. (1995) Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin Immunol Immunopathol*, 76, 187-194.
- Terman, B.I., Carrion, M.E., Kovacs, E., Rasmussen, B.A., Eddy, R.L. y Shows, T.B. (1991) Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 6, 1677-1683.
- Thorpe, P.E. y Burrows, F.J. (1995) Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 36, 237-251.
- Thurston, G., Rudge, J.S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S.D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D.M. y Yancopoulos, G.D. (2000) Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med*, 6, 460-463.
- Torsney, E., Charlton, R., Diamond, A.G., Burn, J., Soames, J.V. y Arthur, H.M. (2003) Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. *Circulation*, 107, 1653-1657.
- Torsney, E., Charlton, R., Parums, D., Collis, M. y Arthur, H.M. (2002) Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res*, 51, 464-470.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. y Wrana, J.L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*, 95, 779-791.
- Tzeng, E., Kim, Y.M., Pitt, B.R., Lizonova, A., Kovesdi, I. y Billiar, T.R. (1997) Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis. *Surgery*, 122, 255-263.
- Vailhe, B. y Feige, J.J. (2003) Thrombospondins as anti-angiogenic therapeutic agents. *Curr Pharm Des*, 9, 583-588.

- Valdivielso, J.M., Crespo, C., Alonso, J.R., Martínez-Salgado, C., Eleno, N., Arévalo, M., Pérez-Barriocanal, F. y López-Novoa, J.M. (2001) Renal ischemia in the rat stimulates glomerular nitric oxide synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280, R771-779.
- Van Belle, E., Rivard, A., Chen, D., Silver, M., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J.F., Bauters, C. y Isner, J.M. (1997) Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines. *Circulation*, 96, 2667-2674.
- van de Kerkhof, P.C., Rulo, H.F., van Pelt, J.P., van Vlijmen-Willems, I.M. y De Jong, E.M. (1998) Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol*, 78, 19-21.
- van den Driesche, S., Mummery, C.L. y Westermann, C.J. (2003) Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor beta signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 58, 20-31.
- Van Royen, N., Piek, J.J., Buschmann, I., Hofer, I., Voskuil, M. y Schaper, W. (2001) Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*, 49, 543-553. (a).
- Van Royen, N., Piek, J.J., Schaper, W., Bode, C. y Buschmann, I. (2001) Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development. *J Nucl Cardiol*, 8, 687-693. (b)
- Vaughan, M.B., Howard, E.W. y Tomasek, J.J. (2000) Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res*, 257, 180-189.
- Vikkula, M., Boon, L.M., Carraway, K.L., 3rd, Calvert, J.T., Diamonti, A.J., Goumnerov, B., Pasyk, K.A., Marchuk, D.A., Warman, M.L., Cantley, L.C., Mulliken, J.B. y Olsen, B.R. (1996) Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell*, 87, 1181-1190.
- Vincent, E.B., Runyan, R.B. y Weeks, D.L. (1998) Production of the transforming growth factor-beta binding protein endoglin is regulated during chick heart development. *Dev Dyn*, 213, 237-247.
- Visconti, R.P., Richardson, C.D. y Sato, T.N. (2002) Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8219-8224.
- Voelkel, N.F., Cool, C., Taraceviene-Stewart, L., Geraci, M.W., Yeager, M., Bull, T., Kasper, M. y Tudor, R.M. (2002) Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung

- vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med*, 30, S251-256.
- Waltenberger, J. (2001) Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovasc Res*, 49, 554-560.
- Wang, H.J., Pieper, J., Schotel, R., van Blitterswijk, C.A. y Lamme, E.N. (2004) Stimulation of skin repair is dependent on fibroblast source and presence of extracellular matrix. *Tissue Eng*, 10, 1054-1064.
- Wang, J.M., Kumar, S., Pye, D., Haboubi, N. y al-Nakib, L. (1994) Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst*, 86, 386-388.
- Wang, J.M., Kumar, S., Pye, D., van Agthoven, A.J., Krupinski, J. y Hunter, R.D. (1993) A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J Cancer*, 54, 363-370.
- Wang, R., Ghahary, A., Shen, Y.J., Scott, P.G. y Tredget, E.E. (1996) Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol*, 106, 419-427.
- Webster, K.A., Discher, D.J. y Bishopric, N.H. (1994) Regulation of fos and jun immediate-early genes by redox or metabolic stress in cardiac myocytes. *Circ Res*, 74, 679-686.
- Weinstein, M., Yang, X. y Deng, C. (2000) Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11, 49-58.
- Wenger, R.H. (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J*, 16, 1151-1162.
- White, K.A. y Marletta, M.A. (1992) Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry*, 31, 6627-6631.
- Whitman, M. (1998) Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev*, 12, 2445-2462.
- Wiesener, M.S., Turley, H., Allen, W.E., Willam, C., Eckardt, K.U., Talks, K.L., Wood, S.M., Gatter, K.C., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. y Maxwell, P.H. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood*, 92, 2260-2268.
- Wieser, R., Wrana, J.L. y Massagué, J. (1995) GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling

- component in the TGF-beta receptor complex. *Embo J*, 14, 2199-2208.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. y Massagué, J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370, 341-347.
- Wu, G., Chen, Y.G., Ozdamar, B., Gyuricza, C.A., Chong, P.A., Wrana, J.L., Massagué, J. y Shi, Y. (2000) Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science*, 287, 92-97.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. y Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.
- Yamasaki, K., Edington, H.D., McClosky, C., Tzeng, E., Lizonova, A., Kovsdi, I., Steed, D.L. y Billiar, T.R. (1998) Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest*, 101, 967-971.
- Yamashita, H., Ichijo, H., Grimsby, S., Moren, A., ten Dijke, P. y Miyazono, K. (1994) Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 269, 1995-2001.
- Yano, K., Brown, L.F. y Detmar, M. (2001) Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest*, 107, 409-417.
- Yeager, M.E., Golpon, H.A., Voelkel, N.F. y Tuder, R.M. (2002) Microsatellite mutational analysis of endothelial cells within plexiform lesions from patients with familial, pediatric, and sporadic pulmonary hypertension. *Chest*, 121, 61S.
- Yin, G., Liu, W., An, P., Li, P., Ding, I., Planelles, V., Schwarz, E.M. y Min, W. (2002) Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther*, 5, 547-554.
- Zawicki, D.F., Jain, R.K., Schmid-Schoenbein, G.W. y Chien, S. (1981) Dynamics of neovascularization in normal tissue. *Microvasc Res*, 21, 27-47.
- Zhang, H., Shaw, A.R., Mak, A. y Letarte, M. (1996) Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J Immunol*, 156, 564-573.
- Zhong, T.P., Childs, S., Leu, J.P. y Fishman, M.C. (2001) Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature*, 414, 216-220.
- Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H.T., Donnini, S., Granger, H.J. y Bicknell, R. (1997) Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest*, 99, 2625-2634.

Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerini, S., Granger, H.J., Maggi, C.A., Geppetti, P. y Ledda, F. (1994) Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest*, 94, 2036-2044.