



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

---

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA**

**PAPEL DE ENDOGLINA  
EN LA BIOLOGÍA DE LOS  
FIBROBLASTOS DE PIEL**

Tesis Doctoral

**MIGUEL PERICACHO BUSTOS**

Salamanca, 27 de junio de 2009



Memoria presentada por Miguel Pericacho Bustos  
para optar al Grado de Doctor en Salamanca, Mayo de 2009

*Fdo: Miguel Pericacho Bustos*



**D. RAFAEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo, elaborado por **D. Miguel Pericacho Bustos** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título: *"Papel de endoglina en la biología de los fibroblastos de piel"* ha sido realizado bajo la dirección conjunta de la Doctora Dña. Alicia Rodríguez Barbero y del Doctor D. José Miguel López Novoa, 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 22 de Mayo de 2009.

Fdo: D. Rafael Jiménez Fernández



LA DOCTORA DÑA. ALICIA RODRÍGUEZ BARBERO, PROFESORA CONTRATADA DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y D. JOSÉ MIGUEL LÓPEZ NOVOA, CATEDRÁTICO DE FISIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo, titulado, *“Papel de endoglina en la biología de los fibroblastos de piel”* presentado por D. Miguel Pericacho Bustos para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizado bajo su 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.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 22 de Mayo de 2009

Fdo: Dña. Alicia Rodríguez Barbero

Fdo: D. José M. López Novoa





Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con las siguientes ayudas:

Beca de formación de personal investigador (cofinanciada con recursos del Fondo Social Europeo) concedida por la Junta de Castilla y León.

Beca del “Instituto Reina Sofía” de la Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo.



# Índices



|                   |      |
|-------------------|------|
| Índice            | I    |
| Índice de figuras | V    |
| Índice de tablas  | VIII |
| Abreviaturas      | IX   |

## **Introducción** **1**

### **1. La piel** **3**

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 1.1. Función y estructura | 3  |
| 1.1.1. Epidermis          | 4  |
| 1.1.2. Dermis             | 5  |
| 1.1.3. Hipodermis         | 6  |
| 1.2 Reparación de heridas | 6  |
| 1.2.1. Fase inflamatoria  | 7  |
| 1.2.2. Fase proliferativa | 8  |
| 1.2.3. Fase de remodelado | 11 |

### **2. El factor de crecimiento transformante $\beta$** **13**

|   |    |
|---|----|
| 2.1. La superfamilia de TGF $\beta$                         | 13 |
| 2.2. Receptores de TGF $\beta$                              | 14 |
| 2.3. Las proteínas Smads                                    | 15 |
| 2.4. Vía de señalización de TGF $\beta$ 1                   | 17 |
| 2.5. Otras vías de señalización activadas por TGF $\beta$ 1 | 19 |
| 2.5.1. Ruta de las MAPKs                                    | 19 |
| 2.5.2. Ruta de PI3K/Akt                                     | 21 |
| 2.6. Funciones biológicas de TGF $\beta$                    | 23 |
| 2.6.1. Papel de TGF $\beta$ en la cicatrización             | 24 |

### **3. Endogлина** **26**

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Expresión y distribución celular                        | 26 |
| 3.2. Estructura  | 27 |
| 3.3. Funciones celulares de endogлина                        | 30 |
| 3.4. Importancia fisiológica y fisiopatológica               | 33 |
| 3.4.1. Telangiectasia hemorrágica hereditaria tipo I (HHT-1) | 33 |
| 3.4.2. Endogлина soluble                                     | 36 |
| 3.4.3. Angiogénesis  | 37 |
| 3.4.4. Procesos tumorales                                    | 38 |
| 3.4.5. Procesos de desarrollo y reparación                   | 40 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Objetivos</b>   | <b>41</b> |
| <b>Material y Métodos</b>  | <b>45</b> |
| <b>1. Experimentos con ratones heterocigóticos en endogлина</b>          | <b>47</b> |
| 1.1. Mantenimiento y manipulación de los animales                        | 47        |
| 1.2. Genotipaje de los animales  | 47        |
| 1.3. Ensayos de cicatrización de heridas cutáneas                        | 48        |
| <b>2. Cultivos celulares</b>   | <b>49</b> |
| 2.1. Generación de cultivos primarios de fibroblastos de dermis de ratón | 49        |
| 2.1.1. Seguimiento y condiciones del cultivo                             | 50        |
| 2.2. Fibroblastos NIH3T3   | 50        |
| 2.3. Tratamiento de los cultivos   | 50        |
| 2.4. Transfecciones transitorias   | 51        |
| 2.4.1. Sobreexpresión transitoria de endogлина                           | 51        |
| 2.4.2. Ensayos de promotor   | 51        |
| 2.5. Infección estable de los fibroblastos NIH3T3                        | 52        |
| <b>3. Análisis de la expresión de proteínas</b>                          | <b>53</b> |
| 3.1. Obtención de extractos de proteínas celulares                       | 53        |
| 3.2. <i>Western blot</i>   | 53        |
| 3.3. Inmunofluorescencia   | 56        |
| 3.4. Histología e inmunohistoquímica                                     | 57        |
| <b>4. Análisis de la expresión génica</b>                                | <b>58</b> |
| 4.1. Extracción de RNA   | 58        |
| 4.2. Obtención de cDNA   | 58        |
| 4.3. PCR semicuantitativa  | 58        |
| 4.4. PCR cuantitativa  | 59        |
| <b>5. Ensayos de proliferación celular</b>                               | <b>60</b> |
| 5.1. Ensayo de proliferación con cristal violeta                         | 60        |
| 5.2. Ensayo de proliferación con MTT                                     | 60        |
| 5.3. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo             | 61        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6. Ensayos de migración celular</b>   | <b>61</b> |
| 6.1. <i>Wound healing</i>  | 61        |
| 6.2. Migración a través de <i>transwell</i>  | 62        |
| <b>Resultados y Discusión</b>  | <b>63</b> |
| <b>1. Cicatrización de heridas cutáneas en ratones haploinsuficientes de endogлина</b>             | <b>65</b> |
| 1.1. Cierre de las heridas cutáneas  | 66        |
| 1.2. Análisis histológico de las heridas   | 67        |
| 1.2.1 Análisis histológico de las heridas en el día 6  | 67        |
| 1.2.2 Análisis histológico de las heridas en el día 12   | 75        |
| <b>2. Generación de un modelo de fibroblastos de piel deficientes de endogлина</b>                 | <b>82</b> |
| 2.1. Caracterización del cultivo   | 83        |
| 2.2. Expresión de endogлина en los fibroblastos de dermis  | 85        |
| <b>3. Efecto de endogлина sobre las propiedades celulares de los fibroblastos de piel</b>          | <b>87</b> |
| 3.1. Efecto de endogлина sobre la proliferación celular de los MDF                                 | 87        |
| 3.2. Efecto de endogлина sobre la migración celular de los MDF                                     | 90        |
| 3.3. Efecto de endogлина sobre la síntesis de matriz extracelular                                  | 92        |
| <b>4. Efecto de TGFβ1 sobre los fibroblastos de piel</b>   | <b>97</b> |
| 4.1. Estudio de la señalización de TGFβ1 a través de Smads en fibroblastos                         | 97        |
| 4.1.1. Expresión de los receptores de TGFβ1 en fibroblastos  | 98        |
| 4.1.2. Activación de las R-Smads en respuesta a TGFβ1  | 98        |
| 4.1.3. Estudio de los elementos de respuesta a TGFβ1 en fibroblastos                               | 99        |
| 4.1.4. Interacción entre ALK1 y ALK5 en la señalización de TGFβ1                                   | 103       |
| 4.2. Efecto de endogлина sobre la ruta de TGFβ1 en fibroblastos de piel                            | 107       |
| 4.2.1. Expresión de los receptores de TGFβ1  | 107       |
| 4.2.2. Activación de las R-Smads en respuesta a TGFβ1  | 108       |
| 4.2.3. Estudio de los elementos de respuesta a TGFβ1 en fibroblastos                               | 108       |
| 4.3. Efecto de endogлина sobre otras rutas de señalización de TGFβ1                                | 111       |
| 4.4. Efecto del tratamiento con TGFβ1 sobre las propiedades biológicas de los fibroblastos de piel | 114       |

|   |            |
|---|------------|
| 5. Efecto de la expresión de endoglina sobre la activación de Akt en fibroblastos | 118        |
| 6. Efecto de Akt sobre la proliferación de los fibroblastos                       | 121        |
| <b>Discusión final</b>  | <b>125</b> |
| <b>Conclusiones</b>   | <b>131</b> |
| <b>Bibliografía</b>   | <b>135</b> |



## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Esquema de la estructura de la piel   | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Fases clásicas de la cicatrización de heridas   | 7  |
| <b>Figura 3.</b> Mediadores moleculares de la vía de señalización de algunos miembros de la familia de TGF $\beta$                                       | 14 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema de la señalización de TGF $\beta$ a través de las proteínas Smads   | 18 |
| <b>Figura 5.</b> Otras vías de señalización activadas por TGF $\beta$  | 19 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema de la vía de señalización de PI3K/Akt   | 22 |
| <b>Figura 7.</b> Efecto de TGF $\beta$ en la herida  | 24 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema de la estructura de la endoglina murina   | 28 |
| <b>Figura 9.</b> Esquema representativo de la estructura del gen de la endoglina murina y del procesamiento alternativo que da lugar a L- y S-endoglina  | 29 |
| <b>Figura 10.</b> Modelo de la regulación de la señalización del TGF $\beta$ 1 por las diferentes isoformas de endoglina                                 | 31 |
| <b>Figura 11.</b> Funciones de la endoglina independientes de TGF $\beta$  | 33 |
| <b>Figura 12.</b> Telangiectasias en pacientes con HHT   | 34 |
| <b>Figura 13.</b> Malformaciones arteriovenosas  | 35 |
| <b>Figura 14.</b> Genotipaje de los ratones heterocigotos  | 48 |
| <b>Figura 15.</b> Aislamiento de las heridas para histología   | 57 |
| <b>Figura 16.</b> Esquema de un <i>transwell</i>   | 62 |
| <b>Figura 17.</b> Evolución del cierre de las heridas cutáneas en ratones <i>Eng</i> <sup>+/+</sup> y <i>Eng</i> <sup>+/-</sup>                          | 66 |
| <b>Figura 18.</b> Tinción con hematoxilina-eosina de heridas de ratones <i>Eng</i> <sup>+/+</sup> y <i>Eng</i> <sup>+/-</sup> en el día 6                | 71 |
| <b>Figura 19.</b> Detección inmunohistoquímica del antígeno Ki67 en heridas de ratones <i>Eng</i> <sup>+/+</sup> y <i>Eng</i> <sup>+/-</sup> en el día 6 | 72 |
| <b>Figura 20.</b> Tinción con Rojo Sirio de heridas de ratones <i>Eng</i> <sup>+/+</sup> y <i>Eng</i> <sup>+/-</sup> en el día 6                         | 73 |
| <b>Figura 21.</b> Detección de $\alpha$ -SMA en las heridas de ratones <i>Eng</i> <sup>+/+</sup> y <i>Eng</i> <sup>+/-</sup> en el día 6                 | 74 |

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 22.</b> Tinción con hematoxilina-eosina de heridas de ratones <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i> en el día 12                | 76  |
| <b>Figura 23.</b> Detección inmunohistoquímica del antígeno Ki67 en heridas de ratones <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i> en el día 12 | 76  |
| <b>Figura 24.</b> Tinción con Rojo Sirio de heridas de ratones <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i> en el día 12                         | 77  |
| <b>Figura 25.</b> Detección de $\alpha$ -SMA en las heridas de ratones <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i> en el día 12                 | 78  |
| <b>Figura 26.</b> Morfología de las células procedentes de ratones <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i>                                  | 83  |
| <b>Figura 27.</b> Expresión de $\alpha$ -Actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y citoqueratina 6 en MDF   | 84  |
| <b>Figura 28.</b> Análisis de la expresión de endogлина a lo largo de sucesivos pases   | 85  |
| <b>Figura 29.</b> Expresión de endogлина en MDF   | 86  |
| <b>Figura 30.</b> Curvas de proliferación de MDF <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i>  | 88  |
| <b>Figura 31.</b> Perfil de ciclo celular de los MDF <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i>  | 88  |
| <b>Figura 32.</b> Expresión de PCNA en MDF en función de la cantidad de endogлина   | 89  |
| <b>Figura 33.</b> Curvas de proliferación de fibroblastos NIH3T3 infectados con endogлина   | 90  |
| <b>Figura 34.</b> Migración celular de MDF <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i>  | 91  |
| <b>Figura 35.</b> Migración celular de fibroblastos NIH3T3 infectados con endogлина   | 92  |
| <b>Figura 36.</b> Síntesis de componentes de la matriz extracelular en MDF <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i>                          | 93  |
| <b>Figura 37.</b> Efecto de la deficiencia de endogлина sobre los fibroblastos de piel  | 93  |
| <b>Figura 38.</b> Expresión de los receptores de la ruta de TGF $\beta$   | 98  |
| <b>Figura 39.</b> Activación de Smad1/2/3 en respuesta a TGF $\beta$ 1  | 99  |
| <b>Figura 40.</b> Activación de Id1 en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$ 1   | 100 |
| <b>Figura 41.</b> Activación de la expresión de PAI-1 en respuesta a TGF $\beta$ 1  | 100 |
| <b>Figura 42.</b> Activación de promotores de elementos de respuesta a TGF $\beta$ en fibroblastos NIH3T3   | 102 |
| <b>Figura 43.</b> Efecto del inhibidor SB431542 sobre la activación de Smads en respuesta a TGF $\beta$ 1   | 103 |

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 44.</b> Efecto del SB431542 sobre la activación de promotores de elementos de respuesta a TGF $\beta$ en fibroblastos NIH3T3 | 104 |
| <b>Figura 45.</b> Expresión de receptores de la ruta de TGF $\beta$ en MDF haploinsuficientes de endogлина                             | 107 |
| <b>Figura 46.</b> Activación de las Smads 1, 2 y 3 en respuesta a TGF $\beta$ 1 en MDF haploinsuficientes de endogлина                 | 108 |
| <b>Figura 47.</b> Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la expresión de Id1   | 109 |
| <b>Figura 48.</b> Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la expresión de PAI-1   | 109 |
| <b>Figura 49.</b> Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la activación de Erk1/2   | 111 |
| <b>Figura 50.</b> Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la activación de p38  | 112 |
| <b>Figura 51.</b> Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la activación de JNK1   | 112 |
| <b>Figura 52.</b> Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la activación de Akt  | 113 |
| <b>Figura 53.</b> Efecto de TGF $\beta$ 1 sobre la proliferación de los MDF <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i>        | 115 |
| <b>Figura 54.</b> Efecto de TGF $\beta$ 1 sobre la migración de los MDF <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i>            | 116 |
| <b>Figura 55.</b> Efecto de la expresión de endogлина sobre la activación de Akt   | 119 |
| <b>Figura 56.</b> Efecto del LY294002 sobre la proliferación de los MDF <i>Eng<sup>+/+</sup></i> y <i>Eng<sup>+/-</sup></i>            | 122 |
| <b>Figura 57.</b> Efecto del LY294002 sobre la proliferación de los NIH3T3 infectados con endogлина                                    | 133 |

## INDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Funciones de la piel                                      | 4  |
| <b>Tabla 2.</b> Citoquinas implicadas en la cicatrización                 | 12 |
| <b>Tabla 3.</b> Construcciones de DNA empleadas para transfección         | 52 |
| <b>Tabla 4.</b> Anticuerpos primarios utilizados en <i>Western Blot</i>   | 54 |
| <b>Tabla 5.</b> Anticuerpos secundarios utilizados en <i>Western Blot</i> | 55 |
| <b>Tabla 6.</b> Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia           | 56 |
| <b>Tabla 7.</b> Cebadores y condiciones de PCR                            | 59 |

# Abreviaturas



- ALK:** *Activin receptor-like kinase* (Quinasa similar al receptor de activina)
- AMH:** *Anti-Mullerian hormone* (Hormona antimulleriana)
- AVM:** *Arterio-Venous Malformation* (Malformación Arterio-Venosa)
- BMP:** *Bone morphogenetic protein* (Proteínas morfogénicas óseas)
- BSA:** *Bovine serum albumin* (Albúmina de suero bovino)
- CDK:** *Cyclin-dependent kinase* (Quinasa dependiente de ciclina)
- CSF-1:** *Colony-stimulating factor-1* (Factor estimulador de la formación de colonias-1)
- DMEM:** *Dulbecco's modified Eagle medium* (Medio Eagle modificado por Dulbecco)
- DNA:** *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- cDNA:** *complementary DNA* (ADN complementario)
- ECL:** *Enzymatic chemiluminescence* (Quimioluminiscencia enzimática)
- EDTA:** *Ethylene diamine tetraacetic acid* (Ácido etilendiaminotetracético)
- EEM:** Error estándar de la media
- EGF:** *Epidermal growth factor* (Factor de crecimiento epidérmico)
- Eng:** Endoglina
- hEng:** Endoglina humana
- mEng:** Endoglina murina
- sEng:** Endoglina soluble
- FBS:** *Fetal bovine serum* (Suero bovino fetal)
- aFGF:** *acidic Fibroblast growth factor* (Factor de crecimiento fibroblástico ácido)
- bFGF:** *basic Fibroblast growth factor* (Factor de crecimiento fibroblástico básico)
- Fox:** *Forkhead box*
- GAPDH:** *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)
- GDF:** *Growth and differentiation factor* (Factores de crecimiento y diferenciación)

**HB-EGF:** *Heparin-binding EGF-like growth factor* (Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina)

**HHT:** *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia* (Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria)

**IFN- $\gamma$ :** Interferón  $\gamma$

**IGF-1:** *Insulin-like growth factor 1* (Factor de crecimiento similar a insulina-1)

**IL-1:** Interleuquina 1

**KGF:** *Keratinocyte growth factor* (factor de crecimiento de queratinocitos)

**MAPK:** *Mitogen-activated protein kinase* (Proteínas quinasa activadas por mitógeno)

**MDF:** *Murine dermal fibroblasts* (Fibroblastos de dermis de ratón)

**MEC:** Matriz extraelular

**MTT:** Metil Tetrazolio

**NO:** *Nitric Oxide* (Oxido nítrico)

**eNOS:** *endothelial Nitric Oxide Synthase* (Oxido Nítrico Sintasa endotelial)

**dNTP:** *deoxyribonucleotide* (desoxirribonucleótido)

**PAI-1:** *Plasminogen activator inhibitor-1* (Inhibidor del activador de plasminógeno-1)

**pb:** Pares de bases

**PBS:** *Phosphate buffered saline* (Tampón fosfato salino)

**PBS-CM:** PBS suplementado con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$

**PCNA:** *Proliferating cell nuclear antigen* (Antígeno nuclear de proliferación celular)

**PCR:** *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

**PDGF:** *Platelet derived growth factor* (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)

**PK1:** *Phosphoinositide-dependent kinase-1* (Quinasa dependiente de fosfoinosítidos)

**PI3K:** *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfoinositol 3-quinasa)

**PIP<sub>3</sub>:** *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* (Fosfatidilinositol 3,5-bifosfato)

**PKC:** *Protein kinase C* (Proteína quinasa C)

**RNA:** *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)



**mRNA:** *messenger RNA* (ARN mensajero)

**siRNA:** *small interference RNA* (pequeño ARN de interferencia)

**RPS13:** *Ribosomal protein S13* (Proteína Ribosomal S13)

**SDS:** *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecilsulfato sódico)

**$\alpha$ -SMA:**  *$\alpha$ -Smooth muscle actin* ( $\alpha$ -Actina de músculo liso)

**TEM:** Transición epitelio-mesénquima

**TGF:** *Transformant growth factor* (Factor de crecimiento transformante)

**TNF- $\alpha$ :** *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ )

**T $\beta$ RI:** Receptor tipo I de TGF $\beta$

**T $\beta$ RII:** Receptor tipo II de TGF $\beta$

**VEGF:** *Vascular endothelial growth factor* (Factor de crecimiento del endotelio vascular)

**ZP:** Zona pelúcida

**ZRP-1:** *Zyxin-related protein*



# Introducción



# 1. La piel

## 1.1. Función y estructura

La piel es el órgano vital más extenso, más delgado y uno de los de mayor relevancia del organismo, ya que es la barrera fisiológica que comunica el organismo con el ambiente externo y a su vez lo protege del mismo. Se encuentra en forma de lámina desplegada que cubre la totalidad de la superficie corporal, así como los orificios naturales a través de las semimucosas y mucosas.

Posee estructuras especialmente adaptadas que le permiten cumplir con múltiples funciones (Tabla 1). Estas son esenciales para mantener la homeostasis y, en consecuencia, para la propia supervivencia y 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, 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 y rica en grasa, que se denomina hipodermis (Figura 1).

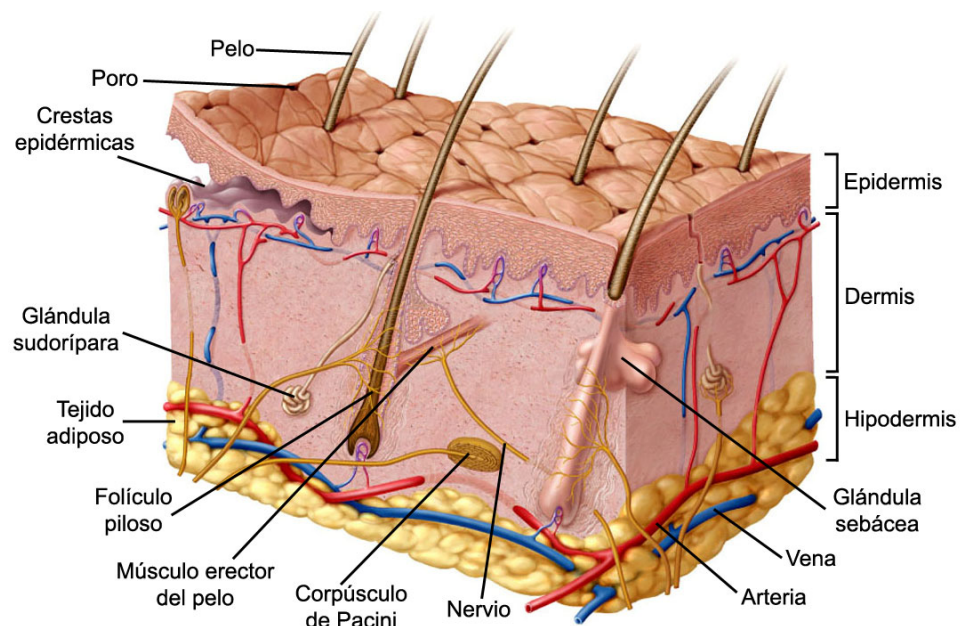


Figura 1. Esquema de la estructura de la piel

**Tabla 1. Funciones de la piel**

| Función                                  | Capa implicada  |
|--|---|
| Barrera                                  | Epidermis<br>Dermis (glándulas sudoríparas)                     |
| Preservación del medio interno           | Epidermis (capa córnea)<br>Dermis                               |
| Absorción de agresiones físicas externas | Dermis<br>Hipodermis  |
| Termorregulación                         | Dermis (vasos sanguíneos y glándulas sudoríparas)<br>Hipodermis |
| Síntesis de vitamina D                   | Epidermis (queratinocitos)                                      |
| Captación de sensaciones                 | Epidermis (células de Merkel)<br>Dermis (inervación cutánea)    |
| Expresión de emociones                   | Dermis (vasos sanguíneos)                                       |
| Lubricación de la superficie cutánea     | Dermis (glándulas sebáceas y sudoríparas)                       |
| Reserva nutricional y energética         | Hipodermis  |
| Cicatrización                            | Epidermis<br>Dermis   |
| Olor                                     | Dermis (glándulas sudoríparas)                                  |

### 1.1.1. Epidermis

La epidermis es un epitelio renovable, pluriestratificado y queratinizado, compuesto principalmente por queratinocitos. Los queratinocitos se organizan en capas de células que representan estados sucesivos de maduración en los que el queratinocito se va diferenciando y adquiere morfologías y funciones particulares. De esta forma, distinguimos las siguientes capas: basal, espinosa, granular y córnea (Alberts, 1996). Solo las células de la capa basal mantienen capacidad proliferativa, por lo que estas células van migrando hacia las capas superiores a la vez que entran en un proceso de diferenciación terminal que culmina con la queratinización y muerte celular en la capa córnea.

Además de queratinocitos, la epidermis contiene melanocitos (células productoras de melanina que luego incorporan los queratinocitos), células de Langerhans (células del sistema inmune), células de Merkel (receptores sensoriales) y células dendríticas (presentadoras de antígeno).

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. La epidermis se comunica con la dermis a través de la membrana basal. Esta lámina, de estructura fibrilar compleja, es ondulada, lo que permite que haya una mayor superficie de contacto entre ambas capas (McGrath *et al.*, 2008).

### 1.1.2. Dermis

La dermis es la capa intermedia y el soporte físico de varias estructuras anatómicas como vasos sanguíneos, vasos linfáticos, receptores sensoriales, folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas, si bien estas últimas no se encuentran en la piel del ratón. Además, la dermis desempeña una función protectora, pues representa la segunda línea de defensa contra los traumatismos, y constituye un enorme depósito potencial de agua, electrolitos y sangre. Principalmente está constituida por un tejido conjuntivo laxo compuesto por fibras de colágeno (95% del material fibrilar) y elastina (menos del 2% del material fibrilar). Además, presenta un componente no fibroso, glicosaminoglicanos y glicoproteínas filamentosas, y células. La célula más abundante de la dermis es el fibroblasto. Los fibroblastos se observan como células fusiformes y su función principal es la síntesis de los distintos componentes de la matriz extracelular. En la dermis también se encuentran otras células, como macrófagos y mastocitos intermediarios de las reacciones alérgicas e inflamatorias.

Se pueden distinguir dos capas funcional y metabólicamente distintas. La capa 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. Además podemos encontrar fibras musculares lisas que corresponden a los músculos erectores de los pelos (McGrath *et al.*, 2008).

### **1.1.3. Hipodermis**

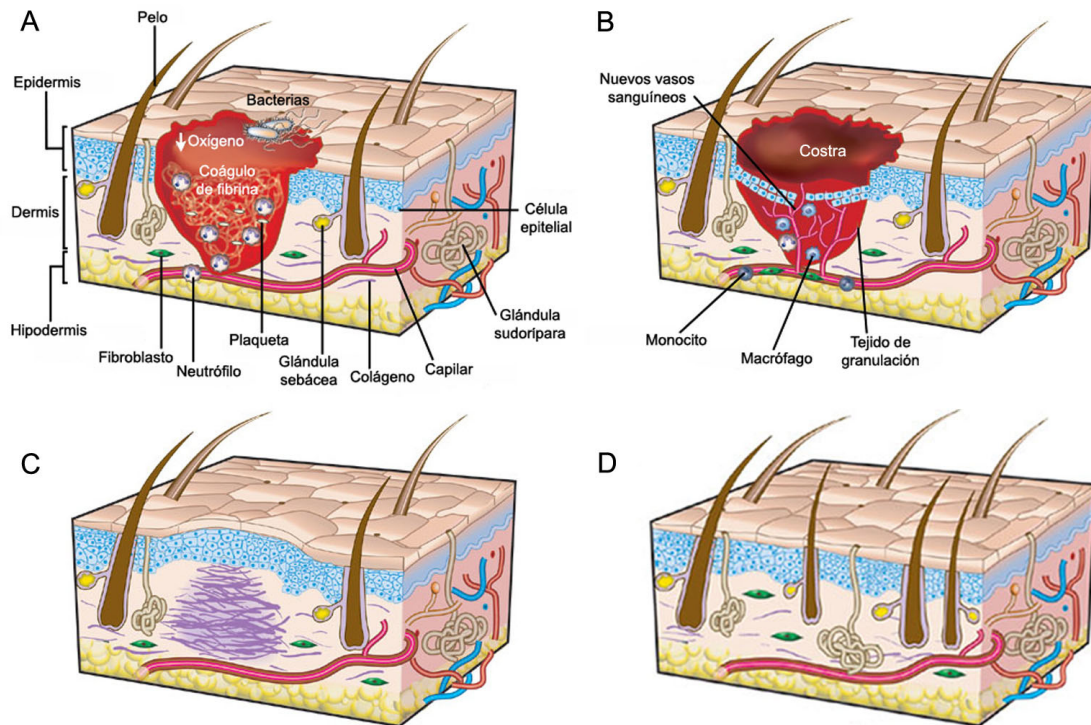
La hipodermis es la capa más interna de la piel y une, débilmente, la dermis con los órganos subyacentes. Esta compuesta por una capa variable de tejido adiposo que ejerce de aislante evitando la pérdida de calor corporal y protegiendo el cuerpo frente a traumatismos superficiales.

## **1.2. Reparación de heridas**

Una herida es una puerta abierta por la que pueden penetrar cuerpos extraños y gérmenes y salir líquidos orgánicos, por tanto su cierre es una necesidad urgente para el organismo. Tras una agresión externa, se ponen en marcha multitud de procesos diferentes e interrelacionados que, aunque finalmente conducen a la reparación del daño, precisan de un fino balance que determinará la respuesta final del organismo. De esta forma, y según el resultado final, podemos distinguir entre: cicatrización, que es el proceso por el cual se genera un nuevo tejido sin las funciones del tejido original; y regeneración, el proceso que implica la creación de tejido nuevo, idéntico al primario, 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 2).





**Figura 2. Fases clásicas de la cicatrización de heridas.** Tras producirse una herida tiene lugar la fase de inflamación (A), en la que se forma el coágulo de fibrina y aparecen células del sistema inmune para limpiar el área dañada. La siguiente fase comprende los días 2 al 10 desde la aparición de la herida y se la denomina fase proliferativa (B). Se caracteriza por la formación de nuevo tejido gracias a la proliferación y migración de diferentes tipos celulares. Por último, durante la fase de remodelado (C), que puede durar meses, se inhiben todos los procesos que se pusieron en marcha en la fase anterior, la mayoría de las células implicadas en ellos sufre apoptosis y se reorganizan las fibras de colágeno depositadas en la fase anterior. En humanos adultos no se produce la regeneración completa de la piel (D) sino que se forma una cicatriz que no tiene todas las propiedades y estructuras de la piel original.

### 1.2.1. Fase inflamatoria

El daño en un tejido causa la rotura de los vasos sanguíneos y, por tanto, la extravasación de componentes sanguíneos al foco de la herida. Esto da lugar, en un primer momento, a una vasoconstricción transitoria que, junto con la activación de la cascada de la coagulación y la agregación plaquetaria, produce el coágulo de fibrina (Figura 2A). El coágulo ayuda a mantener la hemostasia y, además, actúa como matriz extracelular provisional para la migración de los distintos tipos celulares implicados en las siguientes fases de la cicatrización. Las plaquetas no solo facilitan la formación del tapón hemostático, sino que, además, sintetizan distintos factores de crecimiento (Tabla 2), como PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) y TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*), implicados en la quimioatracción de

macrófagos y fibroblastos al foco de la herida (Gurtner *et al.*, 2008; Martin, 1997; Singer y Clark, 1999).

Los neutrófilos son las primeras células que aparecen tras producirse la herida (Figura 2A) y son reclutados en respuesta a diferentes factores derivados de la coagulación, la activación del complemento y a productos de deshecho de las bacterias presentes en la herida. Los neutrófilos comienzan la lisis y fagocitosis de los gérmenes contaminantes y de los cuerpos extraños y, además, producen diferentes factores (Tabla 2) que sirven de señales tempranas para activar a los fibroblastos y queratinocitos locales (Hubner *et al.*, 1996). Los neutrófilos son finalmente expulsados con la costra o fagocitados por los macrófagos por lo que la reacción de limpieza leucocitaria es sustituida y, posteriormente, completada por los macrófagos. Después de 2-3 días, los monocitos son atraídos hacia el tejido dañado por diferentes factores (fibronectina, colágeno, elastina, trombina y TGF $\beta$ ) y se transforman en macrófagos activos. 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 (Gurtner *et al.*, 2008; Martin, 1997; Singer y Clark, 1999).

### **1.2.2. Fase proliferativa**

A medida que va cediendo la fase inflamatoria, comienza la siguiente fase que se desarrolla durante los siguientes 8 días. Durante este periodo, tienen lugar tres procesos fundamentales para la cicatrización de la herida: reepitelización, angiogénesis y fibrogénesis. En estos tres procesos, que se desarrollan de manera simultánea, es imprescindible que se activen la proliferación celular, la migración y la síntesis de componentes de la matriz extracelular. Esta fase se caracteriza por la aparición del tejido de granulación (Figura 2B), que no es más que tejido conjuntivo muy vascularizado cuya función principal es rellenar los espacios muertos. Por lo tanto, es un tejido muy rico en fibroblastos, vasos capilares y colágeno, que, sin

embargo, tiene poca consistencia hasta que no madura y se produce la fibrosis, algo que sucede a lo largo de la siguiente fase.

La reepitelización es un proceso fundamental en la cicatrización de la herida puesto que constituye la regeneración de la barrera de protección. Esta epitelización se lleva a cabo gracias a la proliferación y migración de los queratinocitos desde los bordes, a partir de una estructura denominada epitelio proliferativo, hacia el centro de la herida, por debajo de la costra, hasta formar un epitelio estratificado (Figura 2B). Estos procesos están regulados por múltiples factores entre los que podemos destacar IGF-1 (*Insuline-like Growth Factor 1*), KGF (*Keratinocyte Growth Factor*) y TGF $\beta$ . 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. Hay que tener en cuenta que la epidermis neoformada no es igual a la intacta, puesto que las crestas epidérmicas no son visibles y el epitelio es más grueso en los márgenes de la herida y en la zona central del área reepitelizada (Gurtner *et al.*, 2008; Martin, 1997; Singer y Clark, 1999).

Paralelamente a la reepitelización, también se produce la proliferación de las células endoteliales que da lugar a la angiogénesis, proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. El daño capilar producido con la herida genera un estado de hipoxia (Figura 2A), uno de los factores implicados en la respuesta angiogénica (Knighton *et al.*, 1981). Las moléculas más importantes durante este proceso son bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) y VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), ya que gran parte de las otras citoquinas que participan en el proceso inducen la síntesis de estos dos factores. La neoangiogénesis se produce a partir de las células endoteliales de los capilares abiertos, que por proliferación dan lugar a yemas vasculares que vienen a aportar el oxígeno y los metabolitos necesarios, aunque también puede derivar de células progenitoras endoteliales procedentes de la médula ósea. Durante esta fase se forman numerosos vasos inmaduros de los cuales muchos degeneran y solo algunos permanecen y se estabilizan (Zawicki *et al.*, 1981).

El otro proceso que tiene lugar durante esta fase es la fibroplasia o fibrogénesis. Se denomina fibrogénesis al proceso de síntesis de las fibras que componen la matriz, que sustituye a la red inicial de fibrina. Durante esta fase se produce, por tanto, una degradación de la red inicial junto con la síntesis desorganizada de fibras de colágeno y de otras moléculas de la matriz extracelular. En este proceso, las células más importantes son los fibroblastos, células fundamentales para la reparación de diferentes órganos cuya función principal es sintetizar los componentes básicos del tejido conectivo. Son células que se encuentran en el tejido sano perilesional y que, atraídas por factores liberados durante la fase inflamatoria, migran hacia la herida y se diferencian a su forma más activa, el miofibroblasto. Los miofibroblastos tienen mayor capacidad sintética y migratoria que los fibroblastos residentes y se caracterizan por la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA de  *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin*), lo que les confiere capacidad contráctil. Ellos mismos, a su vez, van a ser fuente de otros factores que reclutan más fibroblastos y otros tipos celulares. Además de colágeno, los fibroblastos también sintetizan otros componentes de la matriz extracelular, como son los proteoglicanos y fibronectina. No se ha descrito que haya síntesis de elastina en respuesta a la lesión, lo que marca la diferencia entre la piel normal y la cicatriz, puesto que esta última carece de elasticidad debido a la ausencia de esta proteína (Gurtner *et al.*, 2008; Martin, 1997; Singer y Clark, 1999).

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 depende de la forma de la herida y de la laxitud del tejido y el mecanismo por el cual se produce aún no está claro, aunque parece que el miofibroblasto tiene un 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 $\beta$ , PDGF, FGF e IFN- $\gamma$ .

### 1.2.3. Fase de remodelado

La tercera fase de la cicatrización comienza 2-3 semanas después de la aparición de la herida y puede durar hasta más de un año. Durante esta fase, todos los procesos que se han iniciado durante la cicatrización se van a ir desactivando, por lo que la mayoría de las células endoteliales, macrófagos y fibroblastos sufren apoptosis o salen del área de la herida dejando una masa prácticamente acelular compuesta, principalmente, por colágeno y otros componentes de la matriz (Figura 2C). Tras unos veinte días de cicatrización, la acumulación de colágeno se estabiliza. Su síntesis está regulada por el propio colágeno de la matriz,  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  y  $\text{TGF}\beta$ . 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 punto, se produce el remodelado de la matriz, es decir, la agregación y reorientación de las fibras de colágeno. Este proceso, que puede durar varios meses, es el responsable del aumento en la fuerza tensil, hasta alcanzar el 80%, siendo este el máximo esperable. El colágeno de nueva síntesis presenta algunas diferencias (organización, tamaño de las fibras, densidad, solubilidad, etc) con respecto al colágeno de la piel normal. Para conseguir el remodelado de la cicatriz entran en juego numerosas enzimas del grupo de las metaloproteasas de matriz con actividad colagenolítica, así como otras enzimas como la hialuronidasa. La síntesis de estas enzimas está modulada por diferentes citoquinas como  $\text{TGF}\beta$ , 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).

Tabla 2. Citoquinas implicadas en la cicatrización (adaptado de Singer y Clark, 1999)

| Citoquina                            | Origen principal                               | Funciones más importantes y células diana   |
|--------------------------------------|--|---|
| <b>Familia EGF</b>                   |  | <b>Regeneración epidérmica y mesenquimal</b>  |
| EGF                                  | Plaquetas                                      | Motilidad y proliferación de todas las células  |
| TGF $\alpha$                         | Macrófagos<br>Células epiteliales              | Motilidad y proliferación de todas las células  |
| HB-EGF                               | Macrófagos                                     | Motilidad y proliferación de todas las células  |
| <b>Familia FGF</b>                   |  | <b>Vascularización de la herida</b>   |
| bFGF                                 | Macrófagos<br>Células endoteliales             | Angiogénesis y proliferación de fibroblastos  |
| aFGF                                 | Macrófagos<br>Células endoteliales             | Angiogénesis y proliferación de fibroblastos  |
| KGF                                  | Fibroblastos                                   | Motilidad y proliferación de células epiteliales  |
| <b>Familia TGF<math>\beta</math></b> |  | <b>Fibrosis e incremento de la fuerza tensil</b>  |
| TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2        | Plaquetas<br>Macrófagos                        | Motilidad de células epiteliales, quimiotaxis de macrófagos y fibroblastos, síntesis y remodelado de la matriz extracelular |
| TGF $\beta$ 3                        | Macrófagos                                     | Efectos regenerativos (anticicatriz)  |
| <b>Otros</b>                         |  |   |
| PDGF                                 | Plaquetas<br>Macrófagos<br>Células epiteliales | Proliferación y quimiotaxis de fibroblastos, quimiotaxis y activación de macrófagos   |
| VEGF                                 | Células epiteliales<br>Macrófagos              | Angiogénesis e incremento de la permeabilidad vascular  |
| TNF $\alpha$                         | Neutrófilos                                    | Inducción de la síntesis de factores de crecimiento en todas las células  |
| IL-1                                 | Neutrófilos                                    | Inducción de la síntesis de factores de crecimiento en todas las células  |
| IGF-1                                | Fibroblastos<br>Células epiteliales            | Reepitelización y formación del tejido de granulación   |
| CSF-1                                | Múltiples células                              | Activación de macrófagos y formación del tejido de granulación  |

## 2. El factor de crecimiento transformante $\beta 1$

Uno de los factores centrales en la cicatrización es TGF $\beta$ , ya que ejerce numerosas funciones sobre la mayoría de los tipos celulares implicados en las diferentes fases de la cicatrización (Tabla 2). Además, algunos autores han demostrado que las heridas que forman peores cicatrices tienen una mayor expresión de TGF $\beta$  (Ghahary *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1995) y que la deficiencia en Smad3 favorece la cicatrización (Ashcroft *et al.*, 1999). Estos hallazgos han puesto a TGF $\beta$  en el punto de mira de diferentes aproximaciones terapéuticas enfocadas a mejorar el proceso de reparación y evitar la formación de cicatriz.

### 2.1. La superfamilia de TGF $\beta$

La superfamilia de TGF $\beta$  engloba un gran número de factores de crecimiento y diferenciación, relacionados estructuralmente entre sí, que están presentes en una gran variedad de organismos, desde insectos hasta humanos. Incluye a las diferentes isoformas de TGF $\beta$ , las BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*), activinas, inhibinas, GDFs (*Growth and Differentiation Factor*) y la AMH (*Anti-Müllerian Hormone*), entre otros (Massague, 1998). Estos factores controlan funciones celulares como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis y la respuesta inmune (Massague, 1998). A nivel tisular controlan el desarrollo, la homeostasis y la reparación de prácticamente todos los tejidos del organismo.

Se han descrito cinco isoformas de TGF $\beta$  con un 64-82% de similitud entre ellas, siendo características de mamíferos las isoformas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$  (Massague, 1990). TGF $\beta 4$  es típica de aves (Kang *et al.*, 2004) y TGF $\beta 5$  de anfibios anuros (Vempati y Kondaiah, 1998). En mamíferos, TGF $\beta 1$  es la isoforma más abundante; está implicado en procesos de desarrollo y diferenciación, inhibe el crecimiento de células epiteliales y endoteliales, así como las funciones inmune y hematopoyética, promueve el crecimiento del tejido conectivo, favorece la quimiotaxis de fibroblastos, macrófagos y linfocitos y estimula los procesos de reparación de tejidos. También está implicado en procesos patológicos, como la producción excesiva de matriz extracelular, que desencadena fibrosis tisular, y la síntesis de

otros factores de crecimiento (Sporn y Roberts, 1992; ten Dijke y Hill, 2004). Todas estas funciones dependen del tipo celular, del balance de expresión de TGFβ y otras citoquinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa (Massague, 1998).

## 2.2. Receptores de TGFβ

La superfamilia de factores de TGFβ transmite sus señales intracelulares a través de glicoproteínas de membrana de tipo serina-treonina quinasa, que forman la familia de receptores de TGFβ. Basándose en sus propiedades estructurales y funcionales, esta familia se ha dividido en dos subfamilias denominadas receptores tipo I y tipo II (Massague, 1998). En mamíferos, se han descrito siete receptores tipo I, que también se denominan ALK (*Activin Like Kinase*) seguido de un número del 1 al 7, y cinco receptores tipo II para los ligandos pertenecientes a la superfamilia de TGFβ (Miyazawa *et al.*, 2002). Cada ligando perteneciente a la superfamilia de TGFβ interacciona de forma específica con combinaciones características de ambos receptores (Figura 3).

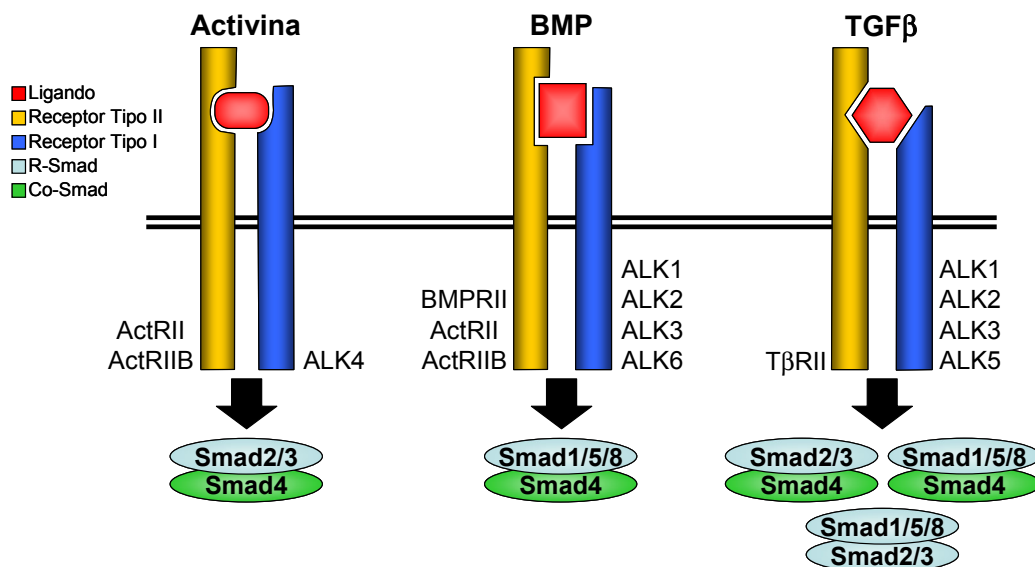


Figura 3. Mediadores moleculares de la vía de señalización de algunos miembros de la familia de TGFβ



En el caso de TGF $\beta$ , al receptor II se le denomina T $\beta$ RII. En la descripción clásica de la señalización de TGF $\beta$ , T $\beta$ RII se asocia con el receptor tipo I (T $\beta$ RI), ALK5. Sin embargo, existen otros T $\beta$ RI implicados en la señalización de TGF $\beta$ : en células endoteliales, TGF $\beta$  señala a través de los receptores tipo I, ALK1 y ALK5 (Goumans *et al.*, 2003a), aunque algunos autores han relacionado también a ALK2 y ALK3 con la señalización de TGF $\beta$  en diferentes tipos celulares (Daly *et al.*, 2008). Además, existen otros receptores accesorios denominados tipo III: betaglicano y endoglina. Los receptores tipo III no poseen dominios quinasa, pero son capaces de unirse a los T $\beta$ RI y T $\beta$ RII y regular la señalización de TGF $\beta$  (Derynck y Zhang, 2003).

Una vez que TGF $\beta$  se une a T $\beta$ RII, que se encuentra constitutivamente fosforilado, este recluta y fosforila al receptor tipo I. Esta fosforilación induce un cambio conformacional en el receptor tipo I que le permite fosforilar a sus sustratos citoplasmáticos: las proteínas Smad. Estas proteínas se translocan, en forma de complejos, al núcleo, donde regulan la transcripción de los genes diana (Massague, 1998).

### 2.3. Las proteínas Smads

Las Smads (*Small mothers against decapentaplegic*) son las proteínas citoplasmáticas que transmiten la señal de TGF $\beta$  de la membrana plasmática al núcleo (Massague y Gomis, 2006; Massague *et al.*, 2005; ten Dijke y Hill, 2004). Las proteínas Smad presentan dos dominios globulares altamente conservados en las regiones amino y carboxilo terminal conocidos como MH1 y MH2 respectivamente (*Mad Homology*). En el dominio MH1 se encuentran motivos de unión al DNA y de interacción con los factores de transcripción, así como la secuencia NLS (*Nuclear Localization Signal*). El dominio MH2 está involucrado en la activación transcripcional y media la oligomerización y la interacción con los receptores ya que posee un motivo SXS, que es fosforilado por los T $\beta$ RI activos. Además, este dominio contiene motivos de interacción con varios factores de transcripción, así como una región de interacción entre Smads. Entre los dominios MH1 y MH2 se ha identificado un dominio central, denominado zona *linker*, poco conservado entre las

distintas especies. Contiene motivos de unión para las proteínas Smurf además de secuencias que pueden ser fosforiladas por varias quinasas como las MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), PKC (*Protein Kinase C*), CDK (*Cyclin Dependent Kinase*), etc.

La familia Smad consta, en mamíferos, de ocho miembros, los cuales se dividen en tres subfamilias según su estructura y función:

**-R-Smads:** Son denominadas Smads reguladas por el receptor. A este grupo pertenecen Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8. El reconocimiento específico del receptor I con su Smad viene determinado por la secuencia conocida como “L45 loop” en el receptor y la secuencia “L3 loop” en el dominio MH2. La región “L3 loop” es una región muy corta y conservada que difiere en tan solo dos aminoácidos entre el grupo de Smad1/5/8 y el grupo de Smad2/3.

**-Co-Smad** o Smad colaboradora: Solo se conoce una en mamíferos: Smad4 (Lagna *et al.*, 1996). Smad4 no tiene motivo SXS en su extremo carboxilo, por lo tanto ni se une ni es fosforilada por los receptores de TGF $\beta$ . Se une a las R-Smads y colabora con estas en su función reguladora de la transcripción. Contiene, en el dominio *linker*, una secuencia de salida del núcleo (NES de *Nuclear Extracellular Signal*) y una secuencia necesaria para la activación de la transcripción.

**-I-Smads:** Smad inhibidoras, representadas por Smad6 y Smad7. Es una subfamilia estructuralmente divergente y su función es inhibir las interacciones Smad-receptor o Smad-Smad, bloqueando la señalización de la vía. Esta subfamilia carece del dominio MH1.

La actividad, distribución subcelular y estabilidad de las tres subclases de Smads presentan una regulación muy compleja y se han identificado un gran número de proteínas que interactúan con las Smads.

## 2.4. Vía de señalización de TGF $\beta$ 1

La unión de TGF $\beta$ 1 al dominio extracelular de T $\beta$ RII induce la formación de complejos hetero-oligoméricos entre los T $\beta$ RI y T $\beta$ RII (Yamashita *et al.*, 1994b) en los que el receptor T $\beta$ RII, constitutivamente activo, fosforila a T $\beta$ RI y activa su dominio quinasa. Esta fosforilación induce un cambio conformacional en el receptor tipo I que le permite fosforilar a las R-Smads en el dominio SXS cercano al extremo C-terminal (Massague *et al.*, 2005). Cada receptor tipo I tiene afinidad por Smads concretas, así Smad 2 y Smad3 son fosforiladas por ALK4, ALK5 y ALK7, mientras que Smad1, Smad5 y Smad8 son fosforiladas por ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6. Las R-Smads son reclutadas por el complejo de receptores, gracias a la proteína SARA (*Smad Anchor for Receptor Activation*), a través del dominio MH2 (ten Dijke y Hill, 2004). La fosforilación de las R-Smads por el receptor tipo I de TGF $\beta$  hace que se liberen de su unión con SARA e, inmediatamente, se unan con Smad4 y se transloquen al núcleo (Figura 4), donde son capaces de regular la transcripción de determinados genes (Massague *et al.*, 2005). Recientemente, se ha descrito la formación de complejos entre Smad1/5/8 y Smad 2/3 que se translocarían al núcleo sin la necesidad de unirse a la Co-Smad (Daly *et al.*, 2008).

Existen diferentes proteínas que regulan negativamente la señalización de la vía, aunque las más importantes son las Smads inhibitorias, o I-Smads, y las ubiquitin ligasas Smurf1 y Smurf2. Las I-Smads compiten con las R-Smads por la unión con los receptores e impiden la activación de las R-Smads; además, las I-Smads son capaces de interactuar con las otras Smads y evitan, de esa forma, la formación de los complejos R-Smad/Co-Smad. Por otro lado, las I-Smads sirven de proteínas adaptadoras para la acción de las Smurfs que marcan tanto a los receptores como a las R-Smads para su degradación en el proteosoma (Zhu *et al.*, 1999). Las I-Smads son inducidas, entre otros factores, por miembros de la propia superfamilia de TGF $\beta$ , por lo que se produce un mecanismo de retroalimentación negativa de la propia ruta de señalización, que sirve como mecanismo autorregulador.

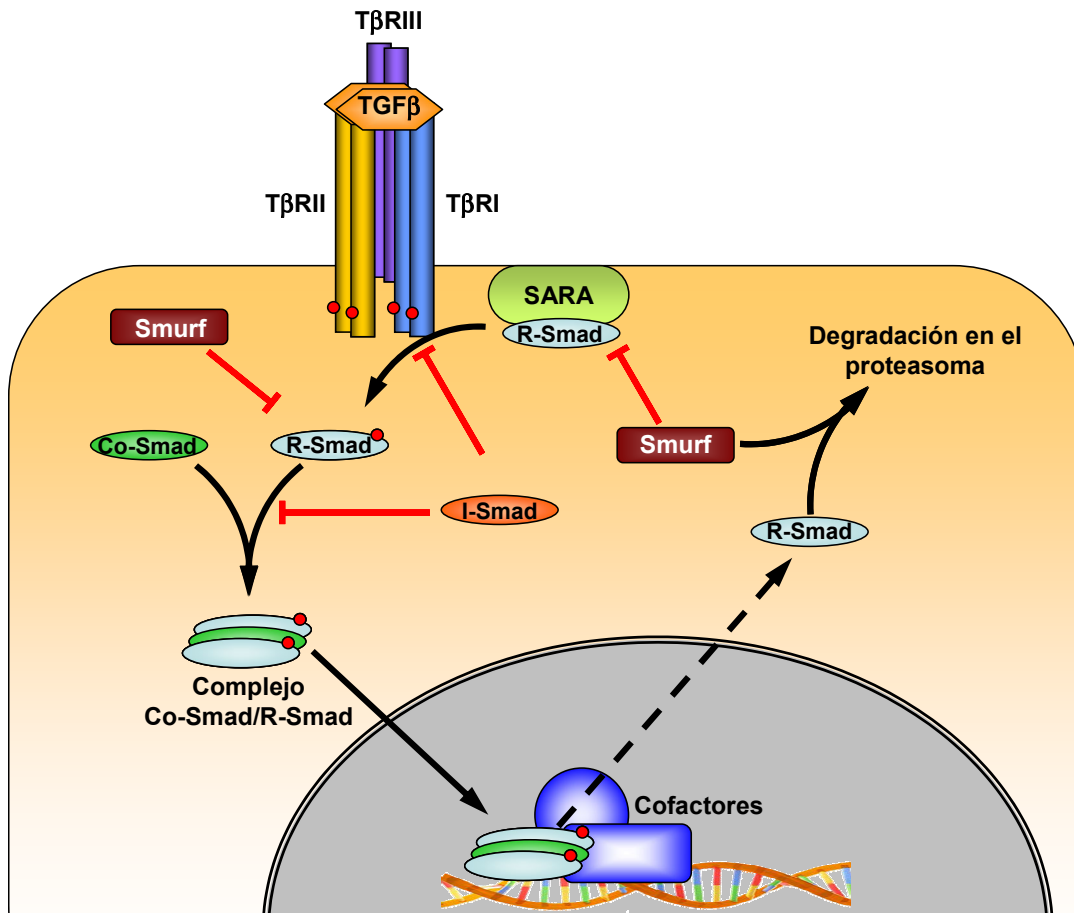


Figura 4. Esquema de la señalización de TGFβ a través de las proteínas Smads

Una vez en el núcleo celular, las Smads pueden participar en la regulación génica de diferentes formas. En primer lugar, Smad3 y Smad4 pueden interactuar directamente con determinadas secuencias del promotor de algunos genes, como *PAI-1* (*Plasminogen Activator Inhibitor 1*), y regular, de esa forma, su transcripción. Sin embargo, como la afinidad de las Smads por el DNA muy baja, es necesaria la ayuda de otros factores de transcripción para unirse con eficacia al DNA. Esta interacción es recíproca, por lo que las Smads también colaboran con otros factores de transcripción, como FAST, AP-1 o HIF-1, en la regulación de la transcripción de diferentes genes. Además, las Smads pueden formar parte de complejos de co-represores o co-activadores de la transcripción. Como estos factores compiten por unirse a las Smads, la concentración relativa de los diferentes complejos o factores, establecida por el tipo y estado funcional de la célula, determinará la respuesta final de la célula a TGFβ.

## 2.5. Otras vías de señalización activadas por TGFβ1

Las Smads son los sustratos más conocidos de los receptores de TGFβ y representan la vía clásica de señalización. Sin embargo, hoy se sabe que existen otras rutas de señalización implicadas en las respuestas celulares a TGFβ1 como las rutas de las MAPKs, NFκB o PI3K/Akt entre otras (Figura 5). Estas vías se pueden activar de forma independiente de la activación de las Smads e interactuar con la vía de señalización de las Smads regulando su actividad (Moustakas y Heldin, 2005; Zhang, 2009).

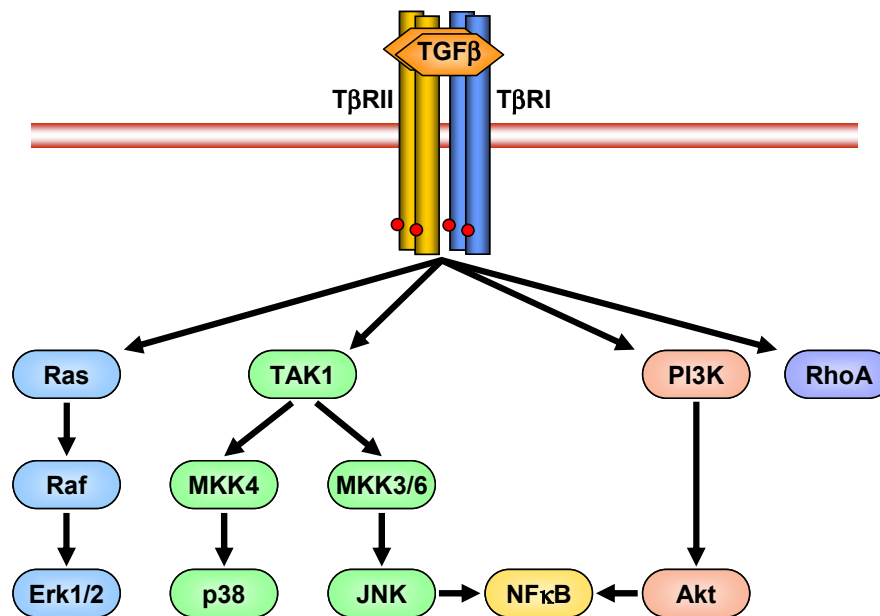


Figura 5. Otras vías de señalización activadas por TGFβ

### 2.5.1. Ruta de las MAPKs

Las MAPKs pertenecen a una familia de serina-treonina quinasas altamente conservadas en eucariotas que están implicadas en respuestas celulares tan importantes como la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Todas las células eucariotas poseen varias vías de MAPKs que se activan preferentemente según el tipo celular o los estímulos que reciban, pero las vías más

características y más estudiadas son: Erk1/2, JNK y p38. Las vías de MAPKs están formadas por tres proteínas quinasas que se fosforilan secuencialmente y conducen los estímulos extracelulares hasta las dianas efectoras. Las MAPKs son fosforiladas y activadas por las MAPKKs que, a su vez, son fosforiladas y activadas por unas serina/treonina quinasas denominadas MAPKKKs o MAP3Ks. En la activación de las MAP3Ks pueden intervenir proteínas G monoméricas (como Ras o proteínas de la familia de Rho) u otras quinasas específicas. La fosforilación de las MAPKs es revertida por la acción de fosfatasas específicas, que modulan así la respuesta de cada vía (Maegawa *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2002).

TGF $\beta$  puede activar tanto la vía de Erk, como la de JNK o la de p38. Aunque, en algunos casos, la activación es una respuesta tardía que parece dependiente de las Smads, TGF $\beta$  es capaz de producir una activación rápida de las MAPKs que, como se ha demostrado mediante experimentos llevados a cabo con siRNAs o dominantes negativos de las Smads, es independiente de la activación de las Smads. Existen diversos estudios que demuestran que TGF $\beta$  activa Ras, por un mecanismo dependiente de la actividad quinasa de los receptores de TGF $\beta$ , y que, de esta forma, se activa la vía de señalización de Erk1/2. La activación de Erk es necesaria para que se lleve a cabo la transición epitelio mesénquima (TEM), una de las funciones biológicas más importantes de TGF $\beta$ , ya que media el desensamblaje de las uniones célula-célula y la inducción de la motilidad inducida por TGF $\beta$ . Además, Erk puede fosforilar en la zona *linker* a las R-Smads ya activadas regulando su actividad (Moustakas y Heldin, 2005; Zhang, 2009). Por último, la activación de la vía Ras/Erk, mediada por TGF $\beta$ 1, puede inducir la expresión del propio TGF $\beta$ 1 y amplificar así la señal (Yue y Mulder, 2000).

La activación de JNK y p38 en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$  está mucho mejor caracterizada que la de Erk1/2. Diferentes experimentos demuestran que TGF $\beta$  es capaz de activar JNK, a través de MKK4, y p38, a través de la activación de MKK3/6, mediante un mecanismo independiente de Smads, pero para el que es necesaria la actividad quinasa de los receptores tipo I. Las quinasas MKK4 y MKK3/6 son MAPKKs activadas, principalmente, por TAK1 (*TGF $\beta$ -activated kinase 1*), pero también por MEKK1 y MLK3. La activación de las MAPKs JNK y p38

mediada por TGF $\beta$  modula la señal mediada por las Smads, ya que se ha demostrado, por ejemplo, que la activación de JNK/p38 favorece la apoptosis inducida por la vía de las Smads. De manera similar, la inhibición de esta vía bloquea la TEM inducida por TGF $\beta$ , por lo que parece que esta vía también está implicada en el desarrollo de ese proceso (Derynck y Zhang, 2003; Zhang, 2009). Además, nuestro grupo ha descrito que la fosforilación de p38 es necesaria para la síntesis de colágeno inducida por TGF $\beta$ 1 (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2006).

### 2.5.2. Ruta de PI3K/Akt

Las fosfatidilinositol-3-quinazas (PI3Ks) son una familia de enzimas que fosforilan fosfatidil inosoles en la posición 3' del anillo de inositol generando segundos mensajeros que controlan la proliferación, la motilidad, la morfología y la supervivencia celular (Bader *et al.*, 2005). Las PI3Ks están subdivididas en 3 clases diferentes (I, II y III) de las cuales las más estudiadas son las PI3Ks clase I, ya que, generalmente, están asociadas con estímulos extracelulares y son las más importantes en la regulación de la proliferación y la tumorigénesis. La clase I de PI3Ks presenta una subunidad catalítica p110 (con cuatro isoformas descritas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) y una subunidad adaptadora reguladora (codificada por tres genes diferentes, p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p55 $\gamma$ ). La subunidad reguladora determina la unión a receptores de membrana activados y recluta a la subunidad catalítica hasta la membrana plasmática, donde puede fosforilar a su sustrato predominante: PI(4,5)P<sub>2</sub>, y generar su producto fundamental: PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, comúnmente denominado PIP<sub>3</sub> (Cantrell, 2001).

Muchos de los efectos biológicos de PI3K están mediados por la activación de la serina-treonina quinasa Akt, también llamada PKB (*Protein Kinase B*). Hasta el momento, se han identificado tres isoformas de Akt: Akt1, Akt2 y Akt3, que comparten una estructura común que contiene un dominio PH (*Plekstrin Homology*) en su extremo N-terminal. Como el dominio PH tiene alta afinidad por el PIP<sub>3</sub>, la actividad de PI3K recluta a Akt a la membrana plasmática, donde es activado mediante la fosforilación de dos residuos específicos: la Thr<sup>308</sup> y la Ser<sup>473</sup> (Figura 6). La fosforilación de Akt en la Thr<sup>308</sup> es necesaria y suficiente para la activación de

Akt, sin embargo se necesita que la Ser<sup>473</sup> se encuentre fosforilada para que se produzca la máxima activación de Akt (Song *et al.*, 2005). La primera quinasa de Akt en ser descubierta fue la responsable de la fosforilación de Akt en la Thr<sup>308</sup>: PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), una quinasa que también tiene el dominio PH y que, por tanto, también es reclutada a la membrana plasmática por PIP<sub>3</sub>. Aunque no ha resultado tan sencillo dilucidar cuál es la quinasa implicada en la fosforilación de la Ser<sup>473</sup>, razón por la que se la denominaba de forma genérica PDK2, algunos autores han propuesto recientemente que la proteína responsable es mTORC2 (Bhaskar y Hay, 2007). Se han identificado multitud de sustratos de Akt, incluyendo, entre otros, la proteína proapoptótica BAD, el factor de transcripción CREB, miembros de la familia Fox (*Forkhead box*), IκB o procaspasa 9. Debido a la gran variedad de proteínas fosforiladas por Akt, esta quinasa ha surgido como un importante mediador en la proliferación, diferenciación, y supervivencia celular, otorgándole un importante papel en la tumorigénesis y la resistencia a quimioterapia (Neri *et al.*, 2002; West *et al.*, 2002).

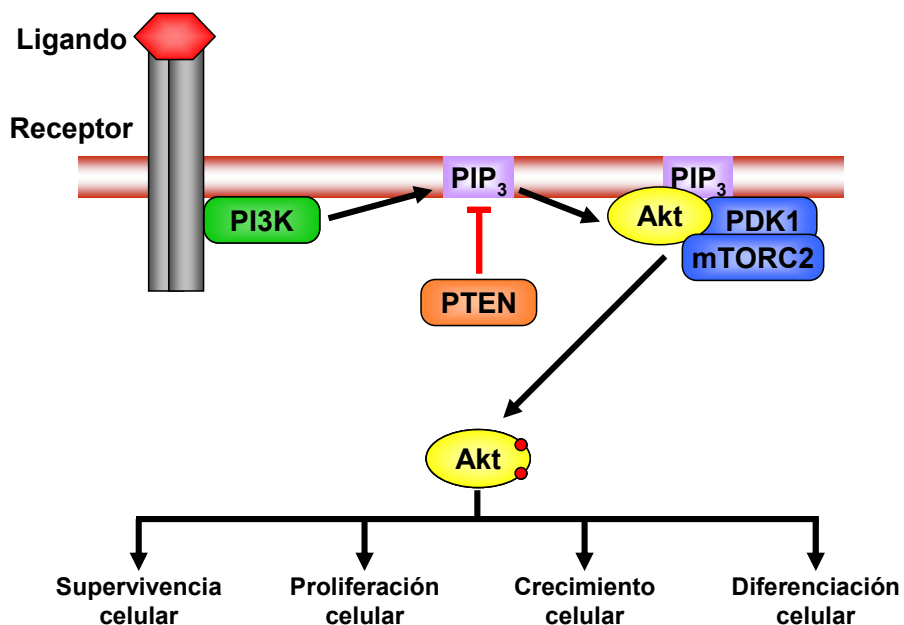


Figura 6. Esquema de la vía de señalización de PI3K/Akt



TGF $\beta$  puede activar, rápidamente y de forma independiente de la activación de Smads, PI3K e inducir, de esa forma, la fosforilación de Akt. Además, se ha demostrado que T $\beta$ RII y p85, la subunidad reguladora de PI3K, colocalizan constitutivamente y que T $\beta$ RI también colocaliza con p85 en respuesta a TGF $\beta$ . Aunque esta asociación entre p85 y los receptores de TGF $\beta$  no es directa, se ha demostrado que la actividad quinasa de los receptores es necesaria para la activación de la vía, ya que el tratamiento con un inhibidor de la actividad de T $\beta$ RI bloquea la activación de Akt en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$ . La vía de PI3K/Akt es otra de las vías de señalización independiente de Smads que contribuye a la TEM inducida por TGF $\beta$ , ya que está implicada en la reorganización de los filamentos de actina y en la migración celular. Además de participar en la TEM, PI3K media las alteraciones morfológicas y el incremento en la expresión de genes de la matriz extracelular y la proliferación celular inducida por TGF $\beta$  en fibroblastos. Por otro lado, la activación de la vía de PI3K/Akt puede inhibir los efectos mediados por las Smads, como, por ejemplo, la inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis, debido a la interacción directa entre Akt y Smad3 y al efecto de Akt inhibiendo la localización nuclear de FoxO, un importante cofactor de las Smads (Moustakas y Heldin, 2005; Zhang, 2009).

## 2.6. Funciones biológicas de TGF $\beta$

Las 3 isoformas de TGF $\beta$  modulan un amplio abanico de actividades biológicas en distintos tipos celulares. Así, TGF $\beta$ 1 participa en la regulación de la proliferación, la apoptosis, la migración y la diferenciación celular. Además, regula la TEM y la angiogénesis y es un potente inductor de la expresión de diferentes proteínas como componentes de la matriz extracelular e integrinas. Sin embargo, es importante resaltar que el efecto específico depende del tipo celular. Por ejemplo, en la mayoría de tipos celulares, TGF $\beta$ 1 se considera un importante factor antiproliferativo, pero promueve la proliferación celular de fibroblastos (Izzi y Attisano, 2006; Werner y Grose, 2003). TGF $\beta$ 1 no solo ejerce diferentes funciones dependiendo del tipo celular, sino que, además, dependiendo del estado de la célula puede ejercer efectos opuestos. De esta forma, en diferentes tipos de tumores, como

el cancer de mama, TGFβ1 comienza actuando como un supresor de tumores en los primeros estadios y, progresivamente, se transforma en un promotor tumoral a medida que se alcanzan los estadios mas avanzados del cancer (Reiss y Barcellos-Hoff, 1997).

### 2.6.1. Papel de TGFβ en la cicatrización

De entre todos los factores que participan en la regulación de la cicatrización (Tabla 2), TGFβ es uno de los más estudiados. Desde el momento en que se produce una herida, se comienza a liberar TGFβ en la zona dañada por acción, en primer lugar, de las plaquetas, pero también por los distintos tipos celulares reclutados a la zona dañada, como neutrófilos, macrófagos, fibroblastos y queratinocitos. Esto hace que a lo largo de la cicatrización siempre encontremos altos niveles de TGFβ que ejerce diferentes funciones sobre las células responsables de la reparación (Figura 7).

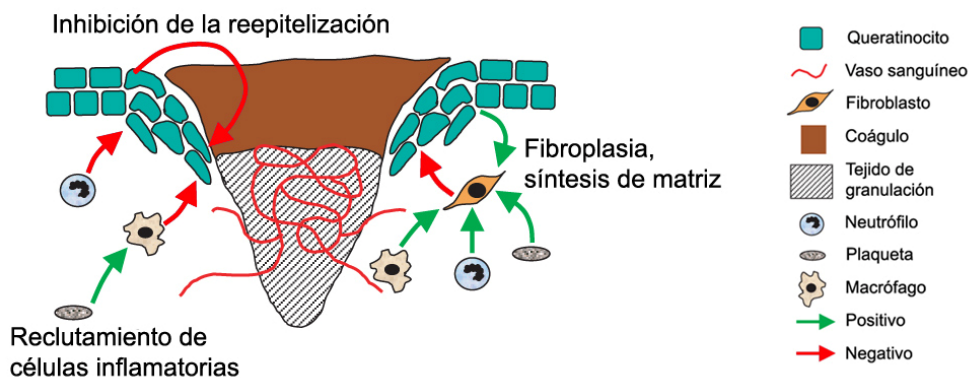


Figura 7. Efecto de TGFβ en la herida (adaptado de Werner y Grose, 2003)

La presencia de TGF $\beta$  en el tejido de granulación parecía corroborar la importancia de este factor para alcanzar una cicatrización eficiente, ya que estimula la angiogénesis, la proliferación de los fibroblastos, la diferenciación de miofibroblastos y la síntesis de matriz extracelular. Además, la aplicación de TGF $\beta$ 1 exógeno en la zona de la herida produce un efecto beneficioso en la cicatrización. Sin embargo, otros estudios que se han llevado a cabo posteriormente no otorgan a TGF $\beta$ 1 un papel tan beneficioso en la cicatrización. En primer lugar, en la reparación de heridas fetales, que no producen cicatriz, se expresa fundamentalmente TGF $\beta$ 3 y apenas hay expresión de TGF $\beta$ 1. La aplicación de TGF $\beta$ 3 o de anticuerpos neutralizantes de TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 reduce la formación de cicatriz en heridas realizadas a ratones adultos. En cambio, la aplicación de TGF $\beta$ 1 a heridas fetales induce la formación de cicatriz tras la reparación. Luego, TGF $\beta$  tiene un papel fundamental en la formación de tejido cicatricial y, por lo tanto, en la recuperación funcional de la herida. Además, en experimentos realizados con ratones modificados genéticamente, se ha demostrado que TGF $\beta$ 1 inhibe la proliferación de los queratinocitos, por lo que se altera la reepitelización y se retrasa el cierre de la herida (Werner y Grose, 2003).

## 3. Endogлина

Endogлина (CD105) fue identificada a mediados de los años 80 con el anticuerpo monoclonal 44G4, generado al inmunizar ratones BALB/c con una línea celular linfoblástica humana (Gougos y Letarte, 1988b). El cDNA de endogлина fue aislado en 1990 y se encontró que la proteína para la que codificaba era una proteína integral de membrana tipo I (Gougos y Letarte, 1990). En 1993, durante el V Taller Internacional sobre antígenos de diferenciación de leucocitos humanos, se le asignó el grupo de diferenciación CD105, ya que aumenta su expresión en la transición de monocito a macrófago (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992). El gen que codifica endogлина (*ENG*) está localizado, en humanos, en el cromosoma 9q34 (Fernandez-Ruiz *et al.*, 1993) mientras que, en ratones, se encuentra en el cromosoma 2 (Qureshi *et al.*, 1995).

### 3.1. Expresión y distribución celular

Los mayores niveles de expresión de endogлина los encontramos en el endotelio vascular, que es donde se identificó originalmente (Gougos y Letarte, 1988b). De hecho se expresa fundamentalmente en todo tipo de células endoteliales, tanto de arterias como de venas o capilares y tanto en células adultas como embrionarias; por lo que es considerada un marcador endotelial (Bourdeau *et al.*, 2000; Cheifetz *et al.*, 1992; Gougos y Letarte, 1988a; Gougos y Letarte, 1988b). Su expresión se ve incrementada en células endoteliales en zonas donde se está produciendo una angiogénesis activa (Bodey *et al.*, 1998c; Burrows *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003), en zonas donde hay una lesión vascular (Botella *et al.*, 2002; Conley *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2000), en el endotelio de algunas patologías de la piel (van de Kerkhof *et al.*, 1998; Westphal *et al.*, 1993), en enfermedades autoinmunes (Marazuela *et al.*, 1995) y en el endotelio de algunos tumores sólidos (Burrows *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003).

Además de en células endoteliales, se ha descrito la expresión de endogлина en células de origen hematopoyético, como precursores de células B (Zhang *et al.*, 1996), proeritroblastos (Buhning *et al.*, 1991), macrófagos (Lastres *et al.*, 1992;

O'Connell *et al.*, 1992) y células estromales de la médula ósea (Robledo *et al.*, 1996; Rokhlin *et al.*, 1995; St-Jacques *et al.*, 1994a). También se expresa en fibroblastos (Gougos y Letarte, 1988a; Robledo *et al.*, 1996), células de músculo liso vascular (Adam *et al.*, 1998), sincitiotrofoblastos de la placenta (Gougos *et al.*, 1992; St-Jacques *et al.*, 1994b), condrocitos del cartílago (Parker *et al.*, 2003), células mesangiales de riñón (Diez-Marques *et al.*, 2002; Rodríguez-Barbero *et al.*, 2001), células estrelladas de hígado (Meurer *et al.*, 2005) y, también, en ciertos tumores como melanomas (Altomonte *et al.*, 1996; Bodey *et al.*, 1998c) o cáncer de próstata (Liu *et al.*, 2002).

Algunos autores han descrito que endogлина puede localizarse en caveolas (Toporsian *et al.*, 2005) y, más recientemente, se ha comprobado que caveolina-1, la proteína mayoritaria de las caveolas, interacciona y coopera con la señalización de TGF $\beta$ /ALK1 (Santibanez *et al.*, 2008).

## 3.2. Estructura

Endogлина es una proteína homodimérica de 180kDa compuesta por dos subunidades de 90kDa unidas por puentes disulfuro (Figura 8). Posee oligosacáridos unidos a las cadenas peptídicas a través de enlaces N-Asn y O-Ser/Thr, que constituyen, aproximadamente, el 20% en peso sobre el total de la glicoproteína (Gougos y Letarte, 1988a). La glicoproteína humana tiene un dominio extracelular de 561 aminoácidos; los primeros 25 aminoácidos corresponden al péptido señal, que dirige a la proteína hacia la membrana donde es eliminado. A continuación, contiene un largo dominio extracelular con varios sitios de N-glicosilación y un dominio conservado implicado en interacciones proteína-proteína, denominado "zona pelúcida" (ZP) (Jovine *et al.*, 2005). Este dominio ZP está compuesto por 260 aminoácidos con, al menos, ocho residuos de cisteína conservados. El dominio ZP está implicado en la oligomerización de endogлина y en interacciones con los receptores de TGF $\beta$ , T $\beta$ RII y ALK5 (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Llorca *et al.*, 2007). En su dominio extracelular, endogлина humana también presenta el tripéptido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), que se considera implicado en adhesión celular (Cheifetz *et al.*, 1992; Gougos y Letarte, 1990). Este péptido se encuentra, fundamentalmente, en proteínas de la matriz extracelular, como

fibronectina, vitronectina, factor von Willebrand, colágeno tipo I y fibrinógeno, y es reconocido por integrinas de la superficie celular (Ruoslahti y Pierschbacher, 1987). Sin embargo, la identidad de las proteínas de tipo integrina que, potencialmente, podrían interactuar con el dominio RGD de endoglina, se desconoce hasta la fecha. La proteína de ratón, a pesar de presentar un 72% de homología con la humana, no presenta el tripéptido RGD (St-Jacques *et al.*, 1994a).

Después del dominio extracelular, endoglina posee una única región transmembrana y un corto dominio citoplasmático que se encuentra constitutivamente fosforilado en células endoteliales y fibroblastos (Lastres *et al.*, 1994; Yamashita *et al.*, 1994a). En sus tres últimos residuos carboxi-terminales se encuentra un dominio de unión a motivos PDZ tipo I de otras proteínas que parece ser importante en la regulación de su fosforilación por parte de los receptores tipo I y II (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Koleva *et al.*, 2006; Lastres *et al.*, 1994).

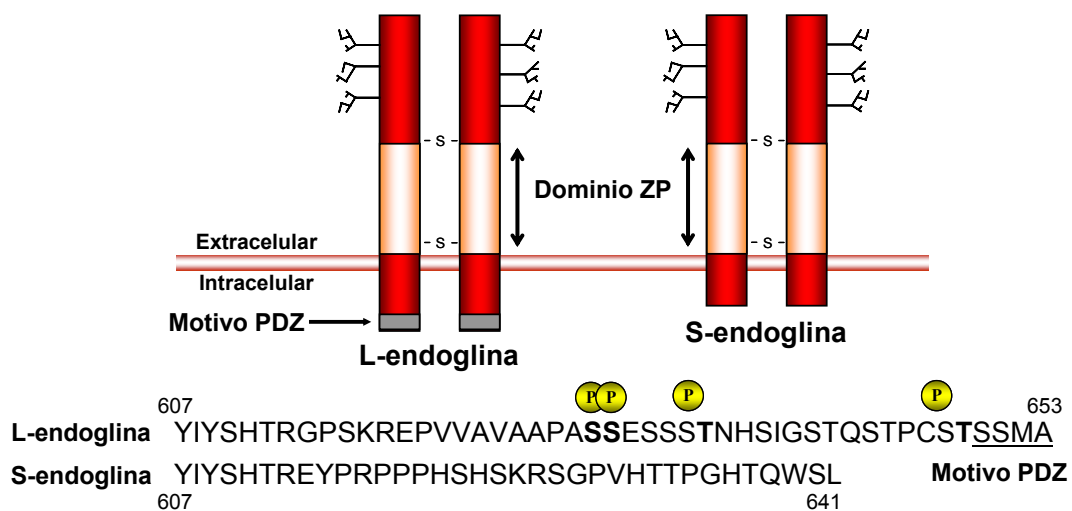


Figura 8. Esquema de la estructura de la endoglina murina (Adaptado de ten Dijke *et al.*, 2008)

Se han descrito dos isoformas distintas de endoglina (L, *large or long*; S, *small or short*) que se originan por *splicing* alternativo (Figura 9) y que difieren, únicamente, en su dominio citoplasmático. La forma predominante es L-endoglina, formada por 658 aminoácidos de los cuales 47 forman el dominio intracelular, mientras que S-endoglina está compuesta por 625 aminoácidos, con una cola corta citoplasmática de 14 aminoácidos. Ambas isoformas solo tienen siete aminoácidos en común en su región intracelular (Bellon *et al.*, 1993). En el caso de la endoglina murina, L-endoglina está compuesta por 653 aminoácidos y S-endoglina por 641 aminoácidos. La diferencia entre ambas isoformas se debe a que, en la isoforma corta, el último intrón de endoglina no se elimina, por lo que permanece en el mRNA maduro. Este intrón introduce un codón de parada prematuro que conduce a la traducción de una proteína más corta (Bellon *et al.*, 1993). La principal diferencia entre las dos isoformas es que S-endoglina carece del motivo PDZ (SMA), presente en la isoforma larga. Además, la isoforma S carece de la Ser<sup>621</sup> (Ser<sup>616</sup> en ratón), un sitio potencial de fosforilación de la proteína quinasa C (PKC) (Lastres *et al.*, 1994). La isoforma L es la forma predominante en células endoteliales mientras que la isoforma S se expresa significativamente en hígado y pulmón (Bellon *et al.*, 1993).

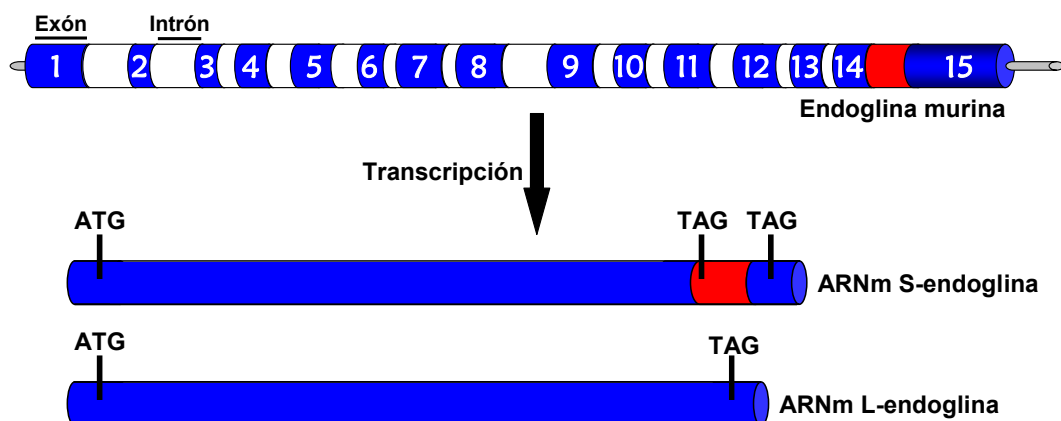


Figura 9. Esquema representativo de la estructura del gen de la endoglina murina y del procesamiento alternativo que da lugar a L- y S-endoglina (Adaptado de Fernandez-L *et al.*, 2006a)

### 3.3. Funciones celulares de endogлина

La proteína endogлина, al no poseer ningún dominio catalítico, es considerada como un receptor auxiliar de TGF $\beta$ , ya que une TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 3 con gran afinidad, pero solo en presencia de los correspondientes receptores tipo I y tipo II. Sin embargo no es capaz de unir TGF $\beta$ 2 (Barbara *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2005; Cheifetz *et al.*, 1992; Letamendia *et al.*, 1998b). En estudios *in vitro*, se ha comprobado que también es capaz de unir otros miembros de la superfamilia de TGF $\beta$ : activina-A, BMP-2 y BMP-7, siempre en presencia de sus respectivos receptores, aunque recientemente se ha visto que puede unir BMP-9 por sí sola, por lo que podría estar implicada en distintas vías de señalización (Barbara *et al.*, 1999; Scharpfenecker *et al.*, 2007).

TGF $\beta$  regula el estado de activación endotelial mediante un equilibrio entre la activación de ALK1 y de ALK5 (Goumans *et al.*, 2002). Mientras que la activación de ALK5 inhibe la proliferación y la migración, ALK1 las estimula (Goumans *et al.*, 2003b). Algunos autores defienden que endogлина favorece la señalización a través de ALK1 en células endoteliales, por lo que estimula su proliferación y migración (Blanco *et al.*, 2005; Lebrin *et al.*, 2004). Según estos autores, endogлина actuaría como un interruptor molecular. En ausencia de endogлина, la señalización de TGF $\beta$ 1 se canalizaría por ALK5 y Smad2/3, lo que conduciría a la inhibición de la proliferación y la migración y, por tanto, a un endotelio quiescente. En presencia de endogлина, la señalización de TGF $\beta$ 1 se desviaría de ALK5 a ALK1 y Smad1/5, lo que promovería la proliferación y migración de las células endoteliales y la angiogénesis. En cambio, otros autores han mostrado que es la deficiencia de endogлина en las células endoteliales la que favorece la señalización por Smad1/5 aumentando la proliferación de estas células (Pece-Barbara *et al.*, 2005). Recientemente, ha aparecido un estudio en el que se muestra cómo endogлина favorece la señalización de TGF $\beta$  a través de Smad1/5 y sugieren que esto produce una inhibición de la migración de las células endoteliales (Lee *et al.*, 2008). Además, se ha encontrado que la forma soluble de endogлина, al igual que ocurre con la forma soluble de betaglicano, bloquea la unión de TGF $\beta$ 1 a sus receptores e inhibe la señalización vía ALK5 en células endoteliales (Levine *et al.*, 2006; Venkatesha *et al.*, 2006). En el último año,



nuestro grupo ha descrito que las isoformas L y S-endoglina modulan de manera diferente la señalización de TGF $\beta$  en mioblastos L6E9 y que esto provoca diferencias en determinadas propiedades celulares (Figura 10). De esta forma, mientras que la sobreexpresión de L-endoglina favorece la señalización por Smad1/5 y promueve la proliferación celular, la sobreexpresión de S-endoglina favorece la fosforilación de Smad3 y aumenta la síntesis de moléculas de la matriz de extracelular (Velasco *et al.*, 2008). Además, estos resultados demuestran, en consonancia con otros estudios (Goumans *et al.*, 2003b; Liu *et al.*, 2009), que para que se produzca la señalización a través de ALK1, es necesaria la presencia funcional de ALK5.

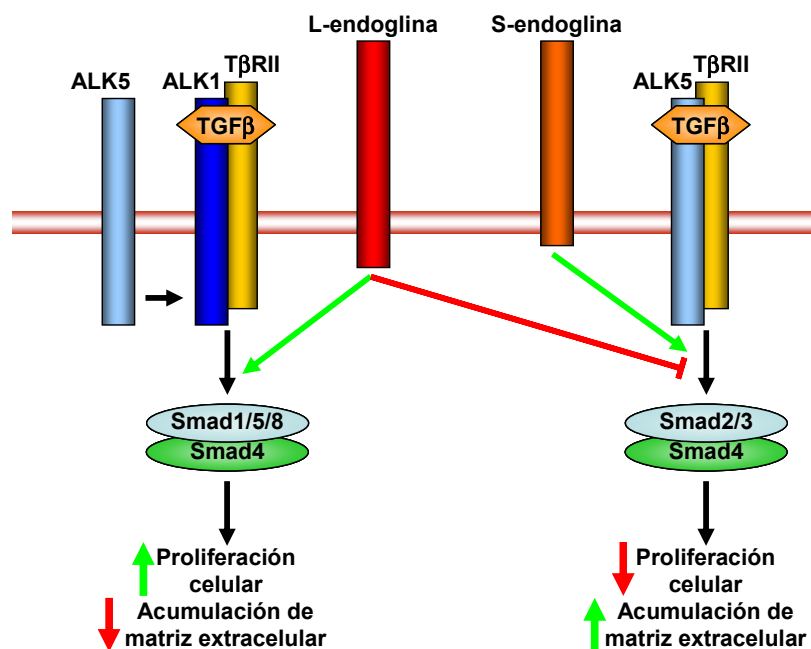


Figura 10. Modelo de la regulación de la señalización del TGF $\beta$ 1 por las diferentes isoformas de endoglina

Varios trabajos han descrito cómo endoglina es capaz de bloquear algunas acciones ejercidas por TGF $\beta$  en distintos tipos celulares (Diez-Marques *et al.*, 2002; Lastres *et al.*, 1996; Letamendia *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000b; Obreo *et al.*, 2004). Se ha propuesto un posible mecanismo de acción según el cual la endoglina secuestraría el ligando y evitaría su unión a los receptores, o bien, regularía directamente la actividad quinasa de los receptores, ya que en presencia de endoglina, la

fosforilación de ambos receptores se encuentra alterada (Barbara *et al.*, 1999; Guerrero-Esteo *et al.*, 2002). Además, TGF $\beta$  aumenta la expresión de endogлина, lo que requiere los factores Sp1 y Smad3 y/o Smad4 (Botella *et al.*, 2001). También se ha demostrado que la hipoxia es un potente estimulador de la expresión del gen de endogлина en células endoteliales y que esta inducción protege las células de la apoptosis inducida por TGF $\beta$  (Li *et al.*, 2003; Sanchez-Elsner *et al.*, 2002).

Además del papel de endogлина como correceptor de TGF $\beta$ , se ha propuesto que debe desempeñar funciones independientes de esta vía de señalización (Figura 11), basándose en el hecho de que en la superficie de la célula endotelial existen 100 veces más moléculas de endogлина que complejos de receptores (Cheifetz *et al.*, 1992; Qu *et al.*, 1998). La sobreexpresión de endogлина en fibroblastos y células de músculo liso vascular conduce a una alteración en la migración, adhesión y morfología celular, lo que sugiere un papel en la organización del citoesqueleto (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999). En concreto, se ha demostrado que endogлина interacciona con proteínas de la familia LIM, como zyxina, que controla la composición de las adhesiones focales y la migración (Conley *et al.*, 2004), y ZRP-1 (*Zyxin-Related protein-1*), que interviene en la organización de las fibras de estrés (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004). También se ha visto que su tallo citoplasmático interacciona con  $\beta$ -arrestina2 alterando la distribución subcelular y la activación de Erk inhibiendo así la migración celular (Lee y Blobel, 2007). Además, la expresión de endogлина reduce la síntesis de colágeno cuando Erk1/2 está activada (Rodriguez-Barbero *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha descrito el papel de endogлина como un importante regulador de la función de la eNOS (*endotelial Nitric Oxide Synthase*), actuando como una proteína de anclaje entre esta y Hsp90 citoplasmática, chaperona fundamental en la actividad de la enzima (Toporsian *et al.*, 2005). A su vez, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado que existe una menor expresión de eNOS en ratones haploinsuficientes para endogлина (Jerkic *et al.*, 2004).

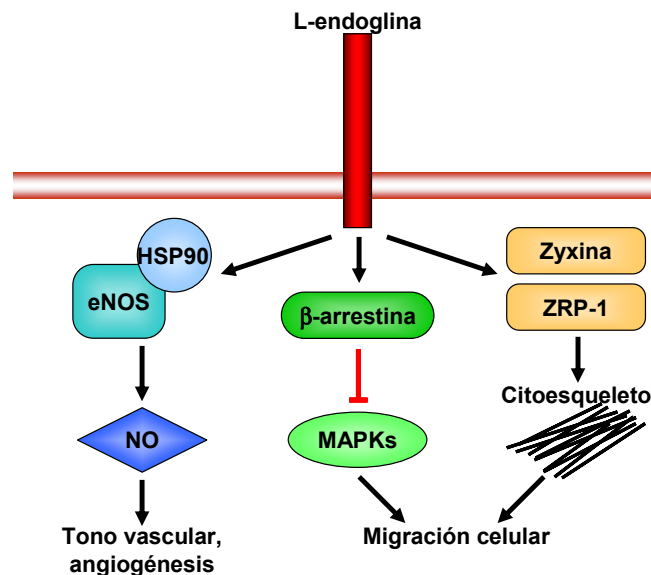


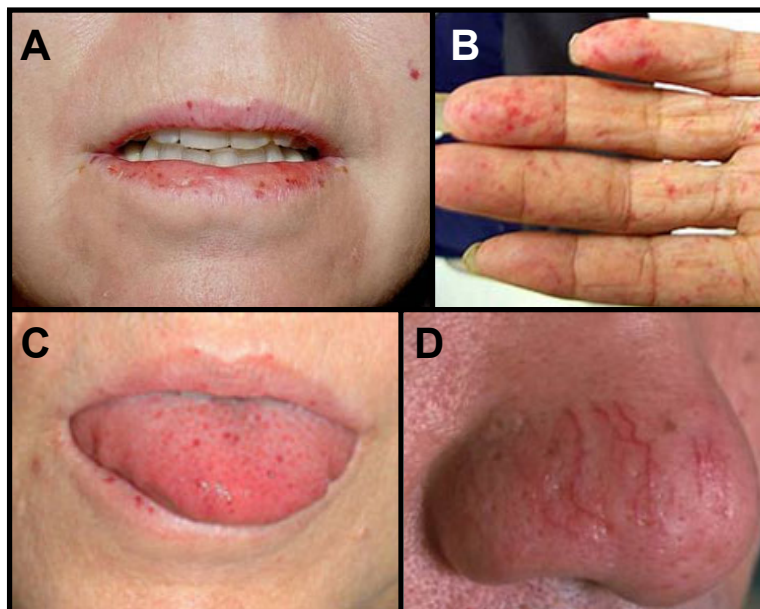
Figura 11. Funciones de la endogлина independientes de TGFβ (Adaptado de Lebrin y Mummery, 2008)

### 3.4. Importancia fisiológica y fisiopatológica

#### 3.4.1. Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo I (HHT-1)

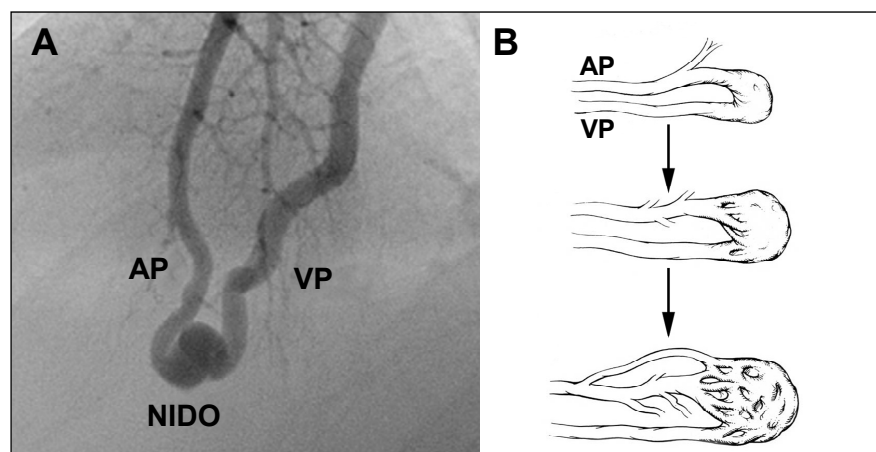
Las mutaciones en el gen de endogлина son causantes de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo I (HHT1) o Síndrome de Rendu-Osler-Weber, que es una enfermedad vascular autosómica dominante. Se caracteriza fundamentalmente por la aparición de estructuras vasculares anormales que conducen a frecuentes hemorragias nasales (epistaxias), telangiectasias y malformaciones arterio-venosas (AVM de *Arterio-venous Malformations*). Las telangiectasias son pequeñas dilataciones de los capilares que se observan clínicamente como manchas rosadas. Aparecen en piel y mucosas, frecuentemente en labios, cavidad oral, nariz, región cercana a las uñas, palmas de las manos o en el tracto digestivo (Figura 12). Las AVM consisten en conexiones directas entre arteriolas y vénulas sin intervención de capilares (Figura 13). Estas estructuras, muy frágiles y que pueden romperse dando lugar a hemorragias, se producen fundamentalmente en órganos internos, como pulmones, hígado, cerebro o médula espinal (Shovlin y Letarte, 1999). Los estudios más recientes indican que la prevalencia media de la HHT se halla en torno a 1/5.000-1/8.000 (Fernandez-L *et al.*, 2006a).

Existen otros tipos de HHT, como la HHT2 caracterizada por mutaciones en el gen de ALK1 (*ACVRL1*) (Johnson *et al.*, 1996). Pero, además, se han encontrado pacientes con características clínicas de HHT sin mutaciones en los genes de endogлина o ALK1, sugiriéndose la existencia de otros genes ligados a la enfermedad. La HHT1 y la HHT2 se consideran clínicamente indistinguibles (Shovlin *et al.*, 2000). El predominio de uno u otro tipo de HHT está relacionado con la localización geográfica, siendo HHT1 más frecuente en Norteamérica, Canadá (Abdalla *et al.*, 2003; Abdalla *et al.*, 2000) o en el norte de Europa (Letteboer *et al.*, 2005), mientras que HHT2 prevalece en países de la cuenca mediterránea como Italia (Lastella *et al.*, 2003), Francia (Lesca *et al.*, 2006) y España (Fernandez-L *et al.*, 2006b; Fontalba *et al.*, 2008). Se han descrito dos *loci* más de HHT en pacientes que no tienen mutaciones en endogлина ni en ALK1: HHT3 en el cromosoma 5 (Cole *et al.*, 2005) y HHT4 en el cromosoma 7 (Bayrak-Toydemir *et al.*, 2006). Algunas mutaciones en el gen de Smad4 (*SMAD4*, cromosoma 18) pueden causar un síndrome que presenta poliposis juvenil y fenotipo de HHT. Este síndrome se conoce como JP-HHT (Gallione *et al.*, 2004).



**Figura 12. Telangiectasias en pacientes con HHT.** Los pacientes con HHT pueden presentar estas telangiectasias en labios (A), palmas de las manos (B), lengua (C) o nariz (D) entre otros.

Hasta la fecha, se han descrito 248 mutaciones distintas en el gen que codifica endogлина, pero este número aumenta de manera continua. Estas mutaciones incluyen deleciones, inserciones y mutaciones sin sentido que, en un 80% de los casos, llevan a la introducción de codones de parada prematuros y, con ello, a proteínas truncadas (Abdalla y Letarte, 2006). Clásicamente, se ha considerado que el mecanismo causante de la enfermedad es la haploinsuficiencia, es decir, la producción de una mutación que provoca una reducción en los niveles de mensajero y de la proteína. De esta forma, las células endoteliales de los enfermos cuentan, únicamente, con la mitad de la proteína y la proteína producida por una sola copia del gen no es suficiente para garantizar una función normal (Marchuk, 1998; Shovlin *et al.*, 1997). Lux y colaboradores han encontrado varias mutaciones en el gen de endogлина que, expresadas *in vitro*, no son capaces de alcanzar la membrana celular, pero que actúan como un dominante negativo secuestrando a la proteína silvestre en el interior de la célula (Lux *et al.*, 2000). La causa molecular de la HHT se ha considerado que es la disfunción de la señalización de TGF $\beta$  en células endoteliales. Se ha visto que, en células endoteliales aisladas de sangre periférica de pacientes con HHT, la vía de señalización de TGF $\beta$  se encuentra alterada (Fernandez-L *et al.*, 2005); además, los niveles plasmáticos de TGF $\beta$  se encuentran reducidos en pacientes con HHT1 (Letarte *et al.*, 2005).



**Figura 13. Malformaciones arteriovenosas.** (A) Angiografía de un paciente que presenta una malformación arteriovenosa pulmonar simple. (B) Esquema de la evolución de una malformación arteriovenosa.

Los ratones heterocigóticos para endoglina (*Eng<sup>+/-</sup>*), que son viables, resultan un buen modelo animal para el estudio de la HHT1 (Bourdeau *et al.*, 1999). Los cultivos de células endoteliales obtenidas a partir de sangre periférica pueden ser también un modelo adecuado para el estudio de las bases moleculares y celulares de la enfermedad, ya que presentan un gran número de alteraciones en sus funciones biológicas que pueden explicar las manifestaciones clínicas de los pacientes (Fernandez-L *et al.*, 2007; Fernandez-L *et al.*, 2005).

### 3.4.2. Endoglina soluble

A pesar de que endoglina es una proteína de membrana, se pueden encontrar bajos niveles de la proteína soluble en plasma (sEng). La aparición de esta forma soluble de la proteína se debe, probablemente, a un corte proteolítico de la isoforma de membrana, como ocurre con betaglicano, que puede ser cortado por la metaloproteasa 1 (MT1-MMP) (Velasco-Loyden *et al.*, 2004). La forma soluble de endoglina puede encontrarse tanto libre como unida a TGF $\beta$ 1 y estos niveles pueden estar aumentados en ciertas patologías. La concentración plasmática de complejos endoglina-TGF $\beta$  se encuentra aumentada en pacientes con cáncer de mama (Li *et al.*, 1998), mientras que altos niveles de endoglina soluble libre parecen correlacionarse con el riesgo de desarrollar metástasis en estos pacientes (Li *et al.*, 2000a). Asimismo, se ha detectado esta correlación en pacientes con cáncer de colon y pulmón (Takahashi *et al.*, 2001); estos estudios indican que la sEng podría servir como marcador pronóstico de la progresión tumoral en varios tipos de cáncer (Fonsatti *et al.*, 2003). Otros estudios muestran una elevada concentración de la proteína soluble en leucemia mieloide aguda, desórdenes mieloproliferativos crónicos (Calabro *et al.*, 2003) y esclerosis sistémica (Fujimoto *et al.*, 2006).

Recientemente, se le ha asignado un papel importante a sEng en la preeclampsia. Esta enfermedad, exclusiva de la gestación de seres humanos y que afecta a un 5% de los embarazos, está caracterizada por un aumento de la presión arterial y proteinuria que causa una alta morbilidad perinatal y mortalidad maternal (Sibai *et al.*, 2005). En el suero de las mujeres embarazadas que presentan esta

enfermedad, se han encontrado altos niveles de sEng que se correlacionan con la gravedad de la alteración (Levine *et al.*, 2006; Venkatesha *et al.*, 2006).

Existen otros trabajos en los que se relaciona sEng con diferentes procesos fisiopatológicos. Por ejemplo, un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio en pacientes que habían sufrido un infarto agudo de miocardio, muestra como una disminución drástica en los niveles de endoglina soluble en plasma después del infarto se correlaciona con un peor pronóstico en la recuperación, es decir, con una mayor morbilidad a corto plazo (Cruz-Gonzalez *et al.*, 2008).

### 3.4.3. Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso muy complejo que permite la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Pepper, 1997). Además de su papel en el desarrollo, la angiogénesis es fundamental en la vida adulta para el mantenimiento de la integridad de los vasos. El papel de endoglina en la angiogénesis se puso de manifiesto con la creación de ratones *knockout* para endoglina. Los ratones deficientes en el gen de endoglina (*Eng*<sup>-/-</sup>) tienen defectos vasculares y cardiovasculares que conducen a su muerte embrionaria aproximadamente entre los días 10-11 de gestación. A día 9, los embriones no son capaces de formar estructuras vasculares maduras en el saco vitelino, observándose la dilatación de los vasos sanguíneos, su ruptura y la presencia de hemorragias (Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Los ratones heterocigotos *Eng*<sup>+/-</sup> tienen un desarrollo vascular normal, pero los ratones adultos poseen deficiencias en la neoangiogénesis tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Duwel *et al.*, 2007; Jerkic *et al.*, 2006b). Las células endoteliales derivadas de estos ratones muestran una menor proliferación, migración e incremento de la producción de colágeno además de una menor producción de óxido nítrico y secreción de VEGF (Jerkic *et al.*, 2006b). La relación directa entre la expresión de eNOS y la expresión de endoglina ha sido descrita por diferentes autores (Jerkic *et al.*, 2004; Toporsian *et al.*, 2005). El incremento de eNOS dependiente de endoglina está mediado, al menos en parte, por un mecanismo post-transcripcional que implica la asociación de la endoglina con proteínas de las caveolas. Allí se asocia con eNOS y modula su

actividad funcionando como una proteína de anclaje con Hsp90, una chaperona fundamental, como ya hemos mencionado, para la actividad de eNOS (Toporsian *et al.*, 2005). Puesto que se ha descrito que TGF $\beta$  aumenta la expresión de eNOS vía Smad2 (Saura *et al.*, 2005), recientemente se ha sugerido que endogлина podría aumentar la expresión de eNOS al incrementar los niveles de Smad2 (Santibanez *et al.*, 2007). Además, la expresión de endogлина se correlaciona inversamente con la expresión de la enzima ciclooxygenasa-2 (Jerkic *et al.*, 2006a), otra enzima implicada en el control de la angiogénesis.

#### **3.4.4. Procesos tumorales**

La noción de que la angiogénesis es crucial en el crecimiento y progresión de los tumores, así como la demostración de que endogлина se sobreexpresa cuando el endotelio está proliferando y su función en la formación de los vasos, sugieren que endogлина puede tener relevancia en el diagnóstico, pronóstico y terapéutica de las enfermedades cancerígenas (Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que la expresión de endogлина se encuentra muy aumentada en la vasculatura de tumores sólidos (Burrows *et al.*, 1995). De hecho, en los vasos de tejidos adultos no malignos, incluyendo lesiones preneoplásicas, la expresión de endogлина es mucho más débil que en los vasos de los tumores y, con frecuencia, se restringe a los capilares (Fonsatti *et al.*, 2000).

Varios estudios han descrito a endogлина como un potente marcador en la vasculatura de diversos tumores sólidos y hematopoyéticos como cancer de mama (Kumar *et al.*, 1999), de próstata (Kassouf *et al.*, 2004), de cerviz (Brewer *et al.*, 2000), colorrectal (Akagi *et al.*, 2002), cáncer de pulmón de células macrocíticas (Tanaka *et al.*, 2001), tumores escamosos de cabeza y cuello (Kyzas *et al.*, 2006), carcinoma renal (Sandlund *et al.*, 2006), adenocarcinoma esofageal (Saad *et al.*, 2005), carcinoma endometrial (Saad *et al.*, 2003), mieloma múltiple (Pruneri *et al.*, 2002) y leucemia de células pilosas (Pruneri *et al.*, 2003). En estudios realizados en células endoteliales procedentes de vasos tumorales se ha encontrado que existe una correlación entre el aumento en la expresión de endogлина y la proliferación, sugiriendo que la supresión de endogлина podría usarse como inhibidor de la angiogénesis tumoral



(Miller *et al.*, 1999). Además, se ha correlacionado el número de vasos positivos para endoglina con el riesgo de desarrollar metástasis en tumores de colon, cáncer oral, carcinoma hepatocelular y cáncer endometrial (Chien *et al.*, 2006; Erdem *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 1999; Romani *et al.*, 2006; Saad *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). Sin embargo, en células de cáncer de próstata, endoglina suprime la adhesión celular, la motilidad y la invasión mediante la activación de la vía TGF $\beta$ 1/ALK2/Smad1 (Craft *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2002); es más, la expresión de endoglina disminuye en la progresión del cáncer de próstata pudiendo tener un papel supresor de tumores en dicho cáncer.

La relación de la 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 *et al.*, 1996), coriocarcinomas (Letamendia *et al.*, 1998a) y tumores de origen hematopoyético, en concreto, de linajes monocíticos (Lastres *et al.*, 1996) y de linfocitos B (Zhang *et al.*, 1996). El papel de endoglina en estas células se ha relacionado con la modulación de la respuesta antiproliferativa de TGF $\beta$ . La pérdida del efecto antiproliferativo de TGF $\beta$  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 $\beta$  (Calabro *et al.*, 2003). Endoglina es también importante en la carcinogénesis epidérmica modulando la señalización de TGF $\beta$ 1 (Perez-Gomez *et al.*, 2007). Por otro lado, la falta de expresión de endoglina disminuye la aparición de tumores, aunque aquellos que se desarrollan son más malignos que los presentes en un fondo genético con niveles normales de endoglina (Quintanilla *et al.*, 2003).

### 3.4.5. Procesos de desarrollo y reparación

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

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 (Qu *et al.*, 1998; Robledo *et al.*, 1996; Rokhlin *et al.*, 1995; St-Jacques *et al.*, 1994a), sin embargo, nadie se ha planteado hasta el momento estudiar el posible papel que puede jugar endogлина en la reparación de heridas.

# Objetivos



Este trabajo se centra en el estudio del efecto de la expresión de endogлина sobre la cicatrización de heridas cutáneas y los procesos celulares que tienen lugar en la misma, así como los mecanismos moleculares que median ese efecto.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar la cicatrización de heridas cutáneas de ratones haploinsuficientes de endogлина.
2. Establecer un modelo celular *in vitro* que nos permita profundizar en las diferencias observadas en la cicatrización de esos ratones.
3. Estudiar el efecto de la expresión de endogлина sobre diferentes propiedades celulares implicadas en la cicatrización.
4. Evaluar el efecto de la expresión de endogлина sobre la señalización y las respuestas celulares a TGF $\beta$ 1.
5. Investigar la implicación de Akt como mediador de los efectos celulares de endogлина en fibroblastos de piel.



# Material y Métodos





# 1. Experimentos con ratones heterocigóticos en endoglina ( $Eng^{+/-}$ )

Estos ratones fueron amablemente cedidos por la Dra. Michelle Letarte (Universidad de Toronto, Canadá). Los ratones heterocigóticos para endoglina ( $Eng^{+/-}$ ) fueron generados mediante recombinación homóloga usando células madre embrionarias de la cepa 129/Ola. Posteriormente, estos se cruzaron con ratones de la cepa C57BL/6 (Bourdeau *et al.*, 1999). En este trabajo se han utilizado los ratones  $Eng^{+/-}$  y sus hermanos de camada homocigóticos  $Eng^{+/+}$ .

## 1.1. Mantenimiento y manipulación de los animales

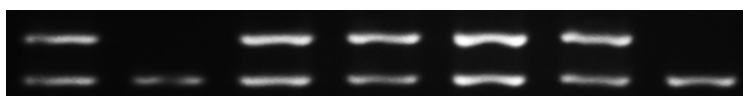
Los ratones utilizados en nuestros experimentos se mantuvieron en régimen de confinamiento controlado en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales se manipularon siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki y los principios del cuidado y la utilización de los animales de experimentación estipulados en las regulaciones internacionales y en las siguientes instituciones europeas y nacionales: la Directiva Europea 86/609/CE de la Unión Europea de 1986, el Convenio ETS 123 del Consejo de Europa de 1986 sobre los animales vertebrados utilizados para experimentación y otros fines científicos, ratificada por España en 1990 y cuya revisión se aprobó en 2006, la Ley del Estado Español 32/2007 de Cuidado de los animales y el Real Decreto 1201/2005 sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y en otros fines científicos.

## 1.2. Genotipaje de los ratones

El genotipo de los ratones se determinó mediante PCR. Para ello, se digirió una pequeña porción del extremo de la cola de los ratones en un tampón de lisis (Tris 100 nM, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, SDS 0,2%) al que se añadió proteinasa K, durante 24 horas a 55° C. Tras la digestión, el sobrenadante se almacenó a -20°C. Con 0,5 µl de dicho sobrenadante, se procedió a la realización de la PCR para la

amplificación de fragmentos específicos del gen de endogлина “silvestre” (o *wildtype*) o mutado. Para ello empleamos los cebadores ya descritos en la literatura (Bourdeau *et al.*, 1999; Rodríguez-Pena *et al.*, 2002).

El producto de la PCR se separó en un gel de agarosa (Cambrex) con un marcador específico de 100 pares de bases (*100 bp DNA Ladder-Invitrogen*). Se comprobaron las bandas de DNA de 300 pb (correspondiente al gen *wildtype*) y de 476 pb (correspondiente al gen mutado) utilizando un equipo *GelDoc* (Bio-Rad). Este estudio indicó la presencia de una sola banda (a 300 pb) para los ratones *Eng<sup>+/+</sup>* y doble banda (a 300 pb y 476 pb) en el caso de los animales *Eng<sup>+/-</sup>* (Figura 14).



**Figura 14. Genotipaje de los ratones heterocigotos.** Muestra de un gel de agarosa con genotipaje *Eng<sup>+/+</sup>* (una sola banda) y *Eng<sup>+/-</sup>* (doble banda)

### 1.3. Ensayos de cicatrización de heridas cutáneas

Los animales 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. Se consideró que este era el sitio idóneo para evitar posibles mordeduras en las heridas, misma razón por la que se dispuso a los animales en jaulas independientes. Con la ayuda de un plástico transparente, se trazó el área inicial de las heridas. Cada dos días los ratones se volvieron a anestesiarse con isoflurano y se trazó el área de cada herida en el plástico transparente hasta que 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).

## 2. Cultivos celulares

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 CO<sub>2</sub>. Las micrografías de células en cultivo con contraste de fase se tomaron con una cámara acoplada a un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon).

### 2.1. Generación de cultivos primarios de fibroblastos de dermis de ratón

Obtuvimos cultivos primarios de fibroblastos de piel de ratón (MDF de *Murine Dermal Fibroblasts*) a partir de un método previamente publicado (Bradshaw *et al.*, 1999) y que se describe a continuación.

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, durante una noche en agitación a 4°C. Todas las soluciones utilizadas en el cultivo contenían penicilina 500 U/ml - estreptomycin 50 µg/ml y anfotericina B 2,5 µg/ml. 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 600 g durante tres minutos, se resuspendió el precipitado y se sembró. El medio de cultivo empleado es DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% FBS (Invitrogen), penicilina 500 U/ml - estreptomycin 50 µg/ml, anfotericina B 2,5 µg/ml. Se sembraron cinco placas petri de 100 mm de diámetro (BD Falcon™) por ratón.

### 2.1.1. Seguimiento y condiciones del cultivo

A las 72 horas, cuando los fibroblastos ya se habían adherido a las placas petri, se lavaron con PBS estéril, para eliminar todo lo que no se había adherido, y se realizó un pase 1:1. Se renovó el medio cuando fue necesario y, cuando las células alcanzaron la confluencia, se hicieron pases sucesivos 1:4 para eliminar las posibles células contaminantes del cultivo, como podrían ser los queratinocitos.

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

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 MDF en pase 4 se comprobó, mediante *Western blot*, que la relación de endogлина entre  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  fuera la correcta (aproximadamente el doble de endogлина en los  $Eng^{+/+}$  que en los  $Eng^{+/-}$ ).

## 2.2. Fibroblastos NIH3T3

Los fibroblastos NIH3T3 proceden de una línea celular obtenida originalmente a partir de fibroblastos embrionarios de ratón y se suelen emplear como un estándar de fibroblastos. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS.

## 2.3. Tratamiento de los cultivos

Para algunos de los experimentos descritos las células se trataron con diferentes sustancias. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en medio de cultivo suplementado con 10% FBS. Los tratamientos con TGF $\beta$ 1 (R&D Systems) se realizaron a una concentración final de 50 pM en una sola dosis tanto en tratamientos agudos como crónicos. El tratamiento con el anticuerpo neutralizante de TGF $\beta$ 1 (R&D Systems), o  $\alpha$ -TGF $\beta$ 1, se realizó a una concentración final de 500

ng/ml. El inhibidor de la actividad quinasa de ALK5, SB431542 (Tocris), se usó a una concentración final de 5  $\mu$ M y el inhibidor de la actividad de PI3K, LY294002 (Sigma-Aldrich), a una concentración final de 10  $\mu$ M. El tratamiento con los inhibidores se añadió 1 hora antes del tratamiento con cualquier agonista.

## 2.4. Transfecciones transitorias

### 2.4.1. Sobreexpresión transitoria de endogлина

Sobreexpresamos endogлина en los fibroblastos de piel mediante la transfección transitoria de vectores de expresión de L-endogлина (Tabla 3). Los fibroblastos se sembraron en placas de 60mm (BD Falcon™) y, cuando alcanzaron el 50-60% de confluencia, se transfectaron mediante el reactivo *jetPEI™ Cationic polymer transfection reagent* (Polyplus-transfection), siguiendo las instrucciones del fabricante, a una N/P (número de residuos de nitrógeno del reactivo por fosfato del DNA) de 5. El *jetPEI™* es un polímero de polietilenimina que compacta el DNA en partículas cargadas positivamente que entran en la célula por endocitosis debido a la interacción con los proteoglicanos aniónicos de la membrana. Transcurridas 24 horas se realizó la extracción de proteínas.

### 2.4.2. Ensayos de promotor

Para realizar los ensayos de promotor, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad que permitiera obtener entre un 70-80% de confluencia en el momento de la transfección. Una vez pegadas, las células se transfectaron con las construcciones de DNA indicadas en cada experimento con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) durante 5 horas, según las instrucciones del fabricante. Después de la transfección, las células se trataron, o no, con TGF $\beta$ 1 durante 24 horas, tras lo cual se midió la actividad luciferasa de las células utilizando el sistema *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Para normalizar los resultados, en todos los casos se co-transfectó la construcción pRL-TK *Renilla Normalizing Luciferase Vector* (Peinado *et al.*, 2003). Ambas actividades luciferasa (Firefly y Renilla) se monitorizaron en un luminómetro *Glomax 20/20 luminometer* (Promega). Cada ensayo se realizó un mínimo de tres veces por cuadruplicado.

## 2.5. Infección estable de los fibroblastos NIH3T3

Generamos, mediante infección con un retrovirus, una línea de fibroblastos NIH3T3 que sobreexpresan la L-endoglina humana. Para ello, se transfectó la línea celular epitelial 293T con el plásmido pCL-Eco, que contiene los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para la formación de la partícula vírica, y con el plásmido pBabe-puro que contenía el gen de la endoglina humana. A las 48 horas, se recogió el medio de cultivo rico en partículas víricas (primer sobrenadante), se pasó por un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) y se suplementó con 4  $\mu\text{g/ml}$  de polibrene (Sigma-Aldrich). Además, se recogió de nuevo el sobrenadante 8 horas más tarde (segundo sobrenadante) en las condiciones ya descritas. Para la infección, se incubaron  $8 \times 10^5$  células con el primer sobrenadante durante 8 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Este proceso se repitió con el segundo sobrenadante. La selección de las células infectadas se llevó a cabo a las 24 horas de la infección mediante el tratamiento con 2  $\mu\text{g/ml}$  de puromicina durante 3 días.

Tabla 3. Construcciones de DNA empleadas para transfección

| Construcción              | Plásmido | Procedencia                      |
|---------------------------|----------|----------------------------------|
| Endoglina humana          | pCMV5    | Cedido por el Dr. C. Bernabéu    |
| mL-Endo                   | pCDNA3   | Cedido por el Dr. M. Quintanilla |
| (CAGA) <sub>12</sub> -Luc | pGL3     | Cedido por el Dr. P. ten Dijke   |
| (Bre) <sub>2</sub> -Luc   | pGL3     | Cedido por el Dr. P. ten Dijke   |
| FAST                      | pGL2     | Cedido por el Dr. M. Quintanilla |
| ARE-Luc                   | pGL2     | Cedido por el Dr. M. Quintanilla |
| pRL-TK                    | pRL      | Promega                          |

## 3. Análisis de la expresión de proteínas

### 3.1. Obtención de extractos de proteínas celulares

Para la obtención de extractos proteicos totales de células en cultivo, se trabajó con las células en un estado de semiconfluencia (aproximadamente un 90%). Tras realizar los tratamientos necesarios, las células se lavaron con PBS frío y se recogieron, con la ayuda de un rascador, en tampón de lisis (Tris – HCl pH 7,5 mM, NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, glicerol 10% y NP-40 (*Igepal CA-630*)) suplementado en el momento del experimento con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). Los extractos se centrifugaron a 10000 g a 4°C durante 10 minutos. Se recuperó la fracción soluble y se midió la cantidad proteica total con *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) y tampón de lisis como patrón, siguiendo el método Bradford, mediante la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976). Los extractos de proteínas se almacenaron a -40°C.

### 3.2. *Western Blot*

El extracto de proteínas se separó mediante una electroforesis vertical en gel *SDS-PAGE*, con distinto porcentaje de poliacrilamida según el tamaño de la proteína para analizar. Para ello, se prepararon las muestras en condiciones desnaturalizantes añadiendo tampón de carga (SDS 2%, glicerol 10%, Tris base 125 mM, azul de bromofenol 0,0005%, pH 6,8,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%) e hirviéndolas a 100°C durante 5 minutos, según el protocolo clásico ya descrito (Laemmli, 1970). El gel se corrió posteriormente en tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 1,7 mM). En aquellas situaciones en las que no eran necesarias condiciones desnaturalizantes, los lisados celulares se mezclaron con el tampón de carga sin  $\beta$ -mercaptoetanol y no se hirvieron.

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en *Western Blot*

| Proteína diana               | Especie | Dilución | Procedencia  |
|------------------------------|---------|----------|--|
| Akt1/2                       | Conejo  | 1/1000   | Santa Cruz Biotechnology   |
| ALK1                         | Rata    | 1/1000   | R&D Systems  |
| ALK5                         | Conejo  | 1/1000   | Santa Cruz Biotechnology   |
| Colágeno I $\alpha$          | Conejo  | 1/1000   | Chemicon   |
| Endoglina humana (TEA1/58.1) | Ratón   | 1/4      | Cedido por el Dr. Sánchez-Madrid (Robledo <i>et al.</i> , 1998)  |
| Endoglina murina (MJ7/18)    | Rata    | 1/10     | Cedido por el Dr. Bernabéu (Ge y Butcher, 1994)                  |
| Erk1/2                       | Conejo  | 1/5000   | Santa Cruz Biotechnology   |
| Fibronectina                 | Ratón   | 1/20000  | Sigma-Aldrich  |
| Fosfo-Akt(Ser)               | Conejo  | 1/1000   | Cell Signaling   |
| Fosfo-Akt(Thr)               | Conejo  | 1/1000   | Cell Signaling   |
| Fosfo-Erk1/2                 | Ratón   | 1/10000  | Santa Cruz Biotechnology   |
| Fosfo-JNK                    | Ratón   | 1/1000   | Santa Cruz Biotechnology   |
| Fosfo-p38                    | Conejo  | 1/1000   | Cell Signaling   |
| Fosfo-Smad1/3                | Conejo  | 1/1000   | Cell Signaling   |
| Fosfo-Smad2                  | Conejo  | 1/10000  | Cedido por el Dr. Peter ten Dijke (Persson <i>et al.</i> , 1998) |
| Id1                          | Conejo  | 1/1000   | Santa Cruz Biotechnology   |
| JNK                          | Conejo  | 1/1000   | Santa Cruz Biotechnology   |
| p38                          | Ratón   | 1/1000   | Santa Cruz Biotechnology   |
| PCNA                         | Ratón   | 1/1000   | BD pharmingen  |
| T $\beta$ RII                | Conejo  | 1/1000   | R&D Systems  |
| $\alpha$ -Tubulina           | Ratón   | 1/5000   | Calbiochem   |



Las proteínas se transfirieron después a una membrana *PVDF-Immobilone* (Millipore) mediante transferencia húmeda, a 400 mA durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente, o transferencia semi-seca, a 20 V durante 30 minutos a temperatura ambiente, en el tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 19,2 mM a un pH 8,3). Tras el proceso de transferencia, se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana, durante una hora a temperatura ambiente en agitación, con BSA (Sigma-Aldrich) al 3% en tampón de lavado (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, KCl 2,5 mM y Tween-20 0,1%).

La membrana de transferencia fue incubada con el anticuerpo primario, a la dilución adecuada (tabla 4), durante 1-2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C, seguido de tres lavados de 7 minutos con tampón de lavado. El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa se incubó con la membrana, a la dilución adecuada (tabla 5), durante 30 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó, de nuevo, antes de detectar la luminiscencia tras la incubación con el reactivo ECL (Millipore). La luminiscencia emitida se detectó en exposición de película (FUJIfilm) de rayos X. Por último se digitalizó la autorradiografía mediante un escáner y el programa *Adobe Photoshop™ 7.0*.

**Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados en *Western Blot***

| Anticuerpos conjugados | Dilución | Procedencia              |
|------------------------|----------|--------------------------|
| Anti-ratón HRP         | 1/15000  | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-rata HRP          | 1/15000  | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-conejo HRP        | 1/20000  | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-cabra HRP         | 1/10000  | Santa Cruz Biotechnology |

### 3.3. Inmunofluorescencia

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal estériles. Una vez alcanzada la confluencia adecuada, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS a temperatura ambiente. A continuación, se fijaron las células con formalina al 4% tamponada a pH 7 (Sigma-Aldrich) y, tras un lavado con PBS, se permeabilizaron, solo en caso de ser necesario, con metanol absoluto a  $-20^{\circ}$  C. Después de la permeabilización, se realizó un nuevo lavado con PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 hora. Tras la incubación, se realizó otro lavado con PBS y se incubaron 1 hora con el anticuerpo secundario. Todos los anticuerpos se prepararon a la concentración indicada (tabla 6) en una solución BSA 0,5% en PBS. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó dos veces con PBS y se tiñeron los núcleos incubando los cubreobjetos en una solución acuosa  $1 \mu\text{M}$  de Hoescht 33258 durante unos segundos. En último lugar se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjetos utilizando *Prolong antifade* (Invitrogen). Analizamos las preparaciones en un microscopio confocal (Leica).

Para la detección de proteínas del citoesqueleto se empleó un protocolo alternativo, ya que el metanol puede desestructurarlo. Por ello, se fijaron las células con p-Formaldehído al 4% durante 10 minutos y se permeabilizaron con una solución de Tritón X-100 0,1%, BSA 0,2% y azida sódica 0,05% en PBS durante 5 minutos.

**Tabla 6. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia**

| Anticuerpo                       | Dilución | Procedencia              |
|----------------------------------|----------|--------------------------|
| Citoqueratina 6                  | 1/200    | Santa Cruz Biotechnology |
| $\alpha$ -Actina de Músculo Liso | 1/200    | Sigma-Aldrich            |
| Anti-ratón Alexa Fluor 546       | 1/100    | Invitrogen               |
| Anti-cabra Alexa Fluor 488       | 1/500    | Invitrogen               |

### 3.4. Histología e inmunohistoquímica

Para poder analizar histológicamente la cicatrización de las heridas, realizamos heridas en los ratones, según el método que ya hemos descrito, y dejamos que cicatrizaran durante el tiempo requerido por el experimento.

Los animales se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Se escogió este método porque implica una mínima manipulación del animal y, de esa forma, se protegen las heridas de posibles daños mecánicos. Se aislaron, mediante disección roma, las heridas y la piel circundante y se fijó el tejido durante 24 horas en formalina al 4%. El trozo de piel se estiró sobre un papel de filtro, previamente humedecido en formalina, para evitar que la piel se enrollase durante el proceso de fijación (Figura 15).

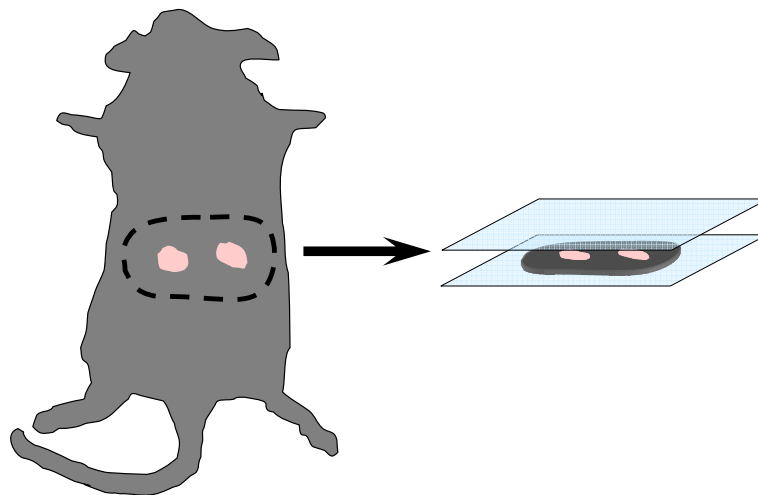


Figura 15. Aislamiento de las heridas para histología

Una vez fijado, el tejido se llevó a la Unidad de patología molecular diagnóstica del Centro de Investigación del Cáncer (CIC, Salamanca), donde se llevaron a cabo el resto de las técnicas de histología e inmunohistoquímica.

## 4. Análisis del nivel de expresión génica

### 4.1. Extracción de RNA

Se sembraron las células en placas de 35 mm y se dejó que alcanzaran un estado de subconfluencia (aproximadamente el 90%). Cuando estuvieron listas, se empleó el kit comercial *NucleoSpin<sup>®</sup>RNA II* (Macherey-Nagel) para aislar el RNA. El RNA obtenido se cuantificó en un *Nanodrop ND-1000* (Nanodrop) y se almacenó a -80°C.

### 4.2. Obtención de cDNA

Con el fin de sintetizar cDNA, se diluyeron 2 µg de RNA de cada muestra con agua DEPC hasta un volumen final de 27,5 µl y se incubaron a 65° C durante 3 minutos. A continuación, se añadieron 12,5 µl de la mezcla previamente preparada, que contenía 2 µl dNTPs (10 mM), 8 µl tampón M-MLV, 1 µl oligodT, 0,5 µl Rnasin<sup>®</sup> (40 U/µl) y 1 µl retrotranscriptasa (RT M-MLV). Los 40 µl totales se incubaron a 42° C durante 90 minutos, tiempo necesario para realizar la retrotranscripción. El cDNA se almacenó a -40°C.

### 4.3. PCR semicuantitativa

La reacción de PCR se realizó sobre un volumen final de 50 µl. Cada tubo de reacción contenía 1 µl del cDNA previamente obtenido, 1 µl de dNTPs, 1 µl de cada cebador, 5 µl de *buffer* (que ya contiene Mg<sup>2+</sup>), 0,4 µl de *FastStart Taq DNA polimerase* (Roche) y 40,6 µl de H<sub>2</sub>O mQ autoclavada. La tabla 7 especifica las secuencias de oligonucleótidos, así como la temperatura de anillamiento, empleadas para PCR semicuantitativa. La reacción se realizó en un termociclador MyCycler (Bio-Rad).

#### 4.4. PCR cuantitativa

En este caso, la PCR se preparó sobre un volumen final de 20  $\mu$ l: 1  $\mu$ l de cDNA, 10  $\mu$ l de la *Supermix iQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup>Green* (Bio-Rad), 0,4  $\mu$ l de cada cebador y 8,2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O mQ. La reacción se llevó a cabo en un termociclador iQ5 (Bio-Rad) y los niveles relativos de expresión se calcularon con el *software* acoplado al termociclador, empleando la expresión de RPS13 (*Ribosomal protein S13*) como *housekeeping*.

Tabla 7. Cebadores y condiciones de PCR

| Gen diana                        | Cebadores (5' – 3')        | Ta(°C) | Tamaño del amplicón (pb) |
|----------------------------------|----------------------------|--------|--------------------------|
| ALK1                             | CTGCTTTGAGTCGTACAAGT       | 59     | 91                       |
|                                  | CCACAATGCCATTGATGATG       |        |                          |
| ALK5                             | CAGACAACAAAGACAATGGG       | 59     | 114                      |
|                                  | ATCATTCCCTCCACAGTAACAG     |        |                          |
| Colágeno I $\alpha$              | TGTTGCTGAAAGACTACCTCGT     | 52     | 285                      |
|                                  | CCTCCCATGTAAATAGCACCT      |        |                          |
| L y S-endoglina (extracelular)   | GACTTCAGATTGGAATACCTTGG    | 59     | 108                      |
|                                  | CAGTGCCGTGTCCTTTCTGTAAT    |        |                          |
| L y S-endoglina (citoplasmático) | TGGTACATCATTCTCACACAC      | 58     | 288 (S) y 149 (L)        |
|                                  | CACTACGCCATGCTGCTGGTGG     |        |                          |
| Fibronectina                     | ATGTGGACCCCTCCTGATAGT      | 59     | 124                      |
|                                  | GCCCAGTGATTCAGCAAAGG       |        |                          |
| GAPDH                            | TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC | 59     | 983                      |
|                                  | CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC   |        |                          |
| T $\beta$ RII                    | GGGCATCGCTCATCTCCAC        | 59     | 70                       |
|                                  | TCCCTGTGAACAATGGGCAT       |        |                          |
| RPS13                            | GATGCTAAATTCCGCCTGAT       | 59     | 120                      |
|                                  | TAGAGCAGAGGCTGTGGATG       |        |                          |

## 5. Ensayos de proliferación celular

### 5.1. Ensayo de proliferación con cristal violeta

Las células se sembraron por triplicado en placas de 24 pocillos ( $5 \times 10^3$  células por pocillo). Al día siguiente, se tomó una placa como día 0 y se incubaron el resto de las células, con o sin tratamiento, el tiempo requerido en cada experimento.

Tras eliminar el medio, las células se lavaron una vez con PBS, a temperatura ambiente, y se fijaron con formalina al 4% durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaron con abundante PBS, se tiñeron con solución de cristal violeta 0,2% (300  $\mu$ l por pocillo) y se incubaron, protegidas de la luz, a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se eliminó la solución de cristal violeta y las células se lavaron 2 ó 3 veces con abundante PBS. Tras este tratamiento, las placas con las células fijadas y teñidas se dejaron secar a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Tras 24 horas, se añadió ácido acético 10% (2 ml en cada pocillo), se homogeneizó el color y se midió en el espectrofotómetro de placas ELx800 (BIO-TEK Instruments) a una longitud de onda de 595 nm.

### 5.2. Ensayo de proliferación con MTT

Para cuantificar la proliferación celular se usó el ensayo de MTT (Metil tetrazolio) que es un ensayo de viabilidad celular basado en la actividad metabólica celular (Mosmann, 1983). La actividad metabólica se determina incubando las células con una sal de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), de color amarillo y soluble en agua, que es reducida por las mitocondrias de las células metabólicamente activas formando un producto de color púrpura (formazán), insoluble en soluciones acuosas, cuya absorbancia puede ser medida en un espectrofotómetro.

Los valores de absorbancia obtenidos son directamente proporcionales al número de células viables. Se añadieron a cada pocillo 50  $\mu$ l de una solución 2 mg/ml de MTT. Tras cuatro horas a 37°C en oscuridad, se añadieron 500  $\mu$ l de solución solubilizadora (HCl 0,01 M, SDS 10%) por pocillo. Las placas se dejaron

toda la noche en el incubador y al día siguiente se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm en un lector de placas.

### 5.3. Determinación del ciclo celular por citometría de flujo

Las células se lavaron una vez con PBS, se trataron con 1 ml de tripsina durante 3 minutos, se recogieron con PBS-CM (ya que el medio de cultivo es autofluorescente), se resuspendieron para evitar la formación de agregados y se contaron en la cámara *Neubauer*. A continuación, se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con PBS. Por último, se fijaron las células con etanol 70% frío durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, las células ya fijadas se lavaron dos veces con PBS, se incubaron con RNasa (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos y se tiñeron con ioduro de propidio (Sigma-Aldrich) durante 1-3 horas, a temperatura ambiente y en agitación continua. Tras este tiempo, se estudió el perfil del ciclo celular en el citómetro FACScalibur (BD). Se empleó el programa *CellQuest* para adquirir los datos y el programa *Modfit* para analizarlos.

## 6. Ensayos de migración celular

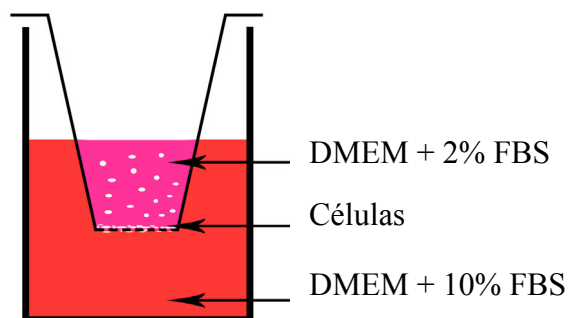
### 6.1. *Wound healing*

Para estudiar la motilidad celular mediante el ensayo de *wound healing*, se sembraron las células en placas de 100 mm y se esperó a que alcanzasen una confluencia del 100%. En este punto, se realizaron varios surcos en la monocapa celular mediante puntas amarillas estériles, intentando que cada uno de ellos quedara de un ancho similar. A continuación, las placas se lavaron varias veces con PBS con el fin de eliminar las impurezas y las células despegadas durante el proceso. Las células se dejaron migrar en el incubador a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>.

Para cuantificar la migración, se tomaron múltiples medidas de la distancia entre los dos frentes de migración, a las 0 horas y a las 24 horas, y se evaluó la distancia migrada mediante la diferencia entre estas distancias. Al realizar los surcos, se marcó la placa para poder hacer las medidas siempre en el mismo punto.

## 6.2. Migración a través de *transwell*

Esta técnica permite medir la capacidad de las células para migrar a través de una membrana con poros de 8  $\mu\text{m}$ . Para ello se sembraron  $10^5$  células en el compartimento superior del *transwell* en medio de cultivo con 2% de suero. El compartimento inferior se rellenó con medio de cultivo con 10% de suero, que sirvió como quimioatrayente (Figura 16). Se sembró el mismo número de células en una placa de 24 pocillos como control de siembra, que se evaluó igual que el tiempo 0 del método de cristal violeta.



**Figura 16. Esquema de un *transwell*.** En él se pueden diferenciar el compartimento superior e inferior del mismo, así como la forma en que se siembran las células..

Pasadas 24 horas, se lavaron los *transwell* con PBS y se eliminaron las células del compartimento superior, que no habían migrado, con un bastoncillo. A continuación se fijaron y tiñeron las que habían migrado a la parte inferior del *transwell* del modo ya descrito en el protocolo de cristal violeta. 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 96 pocillos para después leer la absorbancia en el espectrofotómetro de placas a 595 nm.



# Resultados y Discusión



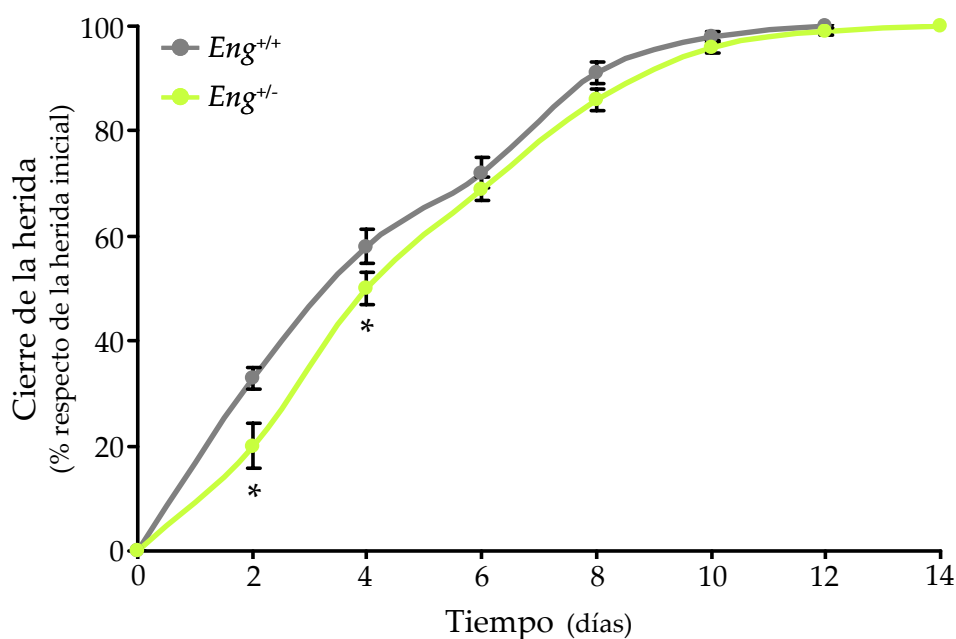
# 1. Cicatrización de heridas cutáneas en ratones haploinsuficientes de endogлина

Nuestro grupo de investigación lleva varios años interesado en el estudio del papel que juega la expresión de endogлина en diferentes procesos fisiopatológicos como la fibrosis renal, el mantenimiento del tono vascular, la inflamación o la angiogénesis (Jerkic *et al.*, 2004; Jerkic *et al.*, 2006a; Jerkic *et al.*, 2006b; Rodriguez-Pena *et al.*, 2002). Dado que tanto la angiogénesis como el equilibrio en la producción de matriz extracelular son fundamentales durante los procesos de reparación y que existen numerosos estudios que relacionan a endogлина con ambos procesos, nos planteamos estudiar el papel de endogлина en la cicatrización de heridas. Para llevar a cabo estos estudios, hemos utilizado un modelo de deficiencia de endogлина: la cepa de ratones heterocigotos para endogлина ( $Eng^{+/-}$ ) generada en el laboratorio de la Dra. Michelle Letarte (Bourdeau *et al.*, 1999). A través de diferentes estudios (Jerkic *et al.*, 2004; Rodriguez-Pena *et al.*, 2002), nuestro grupo ha demostrado que los ratones heterocigotos para endogлина son haploinsuficientes, es decir, la deficiencia de una de las copias del gen de endogлина produce una reducción en la expresión tanto del mRNA como de la proteína. Esto no sucede en todas las líneas de ratones heterocigóticas, por ejemplo, una línea de ratones heterocigotos para eNOS ( $eNOS^{+/-}$ ) no presenta deficiencias en la expresión de eNOS al compararlos con los ratones *wildtype* (Kojda *et al.*, 1999). Ya que los ratones *knockout* para endogлина ( $Eng^{-/-}$ ) mueren durante la gestación (Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999), los ratones heterocigotos son el mejor modelo de que disponemos en la actualidad para el estudio de la implicación de endogлина en diferentes procesos fisiopatológicos, como la reparación de heridas.

Para analizar el efecto de la expresión de endogлина sobre los procesos de cicatrización utilizamos un modelo de inducción de heridas cutáneas en los ratones. Con este modelo pudimos evaluar tanto el tiempo que tardan en cerrarse las heridas como la estructura histológica de las mismas.

## 1.1. Cierre de las heridas cutáneas

Una vez realizadas las heridas, medimos el área de las mismas cada 2 días y representamos el porcentaje de cierre de la herida respecto a la herida inicial. Al analizar la evolución del cierre de las heridas a lo largo del tiempo se observa un retraso en la cicatrización de estas en los animales haploinsuficientes de endogлина ( $Eng^{+/-}$ ) con respecto a los controles ( $Eng^{+/+}$ ). Transcurridos 12 días, las heridas de los ratones control están completamente cerradas, sin embargo, en los ratones  $Eng^{+/-}$  esto sucede 1 ó 2 días más tarde. No obstante, las mayores diferencias las encontramos en los primeros días. En los días 2 y 4 observamos un retraso significativo en la cicatrización de los ratones deficientes de endogлина. Sin embargo, a medida que van pasando los días, estas diferencias, lejos de aumentar, van disminuyendo de forma que a partir del día 6 no encontramos diferencias significativas al comparar el porcentaje de cierre de las heridas de los ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  (Figura 17).



**Figura 17. Evolución del cierre de las heridas cutáneas en ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ .** Medimos el área de la herida a lo largo del tiempo hasta que las heridas se cerraron. Representamos la media  $\pm$  EEM (n=20) del porcentaje del área de la herida que sigue abierta en función de la herida inicial.\*  $p < 0,05$  vs  $Eng^{+/+}$ .

## 1.2. Análisis histológico de las heridas

Con el propósito de profundizar en el análisis del retraso observado en la cicatrización de los ratones haploinsuficientes en endogлина, realizamos un estudio histológico de las heridas. Para ello, recogimos la piel y las heridas de los ratones en el día 6, que se corresponde con la mitad del tiempo necesario para la cicatrización, y en el día 12, donde las heridas están recién cicatrizadas. De esta forma, podemos estudiar si el retraso que observamos en el análisis macroscópico de la cicatrización se debe a alteraciones en los procesos de cicatrización.

### 1.2.1. Análisis histológico de las heridas en el día 6

La **tinción con hematoxilina-eosina** de las preparaciones nos permite detectar las diferentes estructuras características del proceso de cicatrización. En un primer análisis, a pocos aumentos, ya se pueden apreciar perfectamente diferencias entre los ratones *Eng<sup>+/+</sup>* y *Eng<sup>+/-</sup>* en el aspecto general de las heridas (Figura 18A y 18B, respectivamente). En las heridas de los ratones control (Figura 18A) se pueden apreciar distintas estructuras características del proceso de cicatrización como son la costra (c), donde se aprecian restos celulares derivados de la fase inflamatoria, las zonas de proliferación de los queratinocitos en los bordes de la herida (ep) y el tejido de granulación (g) en los laterales y en el centro de la herida, que contrasta con las estructuras características de la piel normal (pn). Por debajo de la herida se puede apreciar una capa de tejido muscular (m). A más aumentos (Figura 18C), se aprecia cómo, desde los engrosamientos de la epidermis, formados en los extremos de la herida, existe una continuidad celular que se corresponde con el epitelio recién formado (e). En la zona central de la herida, se diferencia bien esa capa de epidermis recién formada que separa la costra de algunos restos de la reacción inflamatoria (i) y del tejido de granulación (detalle: figura 18E). También observamos la aparición de vasos sanguíneos (vs) en la región basal de la herida.

En las heridas procedentes de los ratones haploinsuficientes de endogлина (Figura 18B) también se aprecian los bordes engrosados de la epidermis y el tejido de granulación, pero estas heridas se caracterizan por la presencia de un gran número de células inflamatorias en la zona central de la herida, que aún no se han eliminado completamente en la costra, y la ausencia de reepitelización. Al estudiar a más aumentos el borde de la herida (Figura 18D), se observa cómo todavía no se ha formado la nueva capa de epidermis, ya que aún hay reacción inflamatoria en la zona. En el borde de la herida se aprecia, también, el tejido de granulación y, debajo de este, se distingue una zona constituida, principalmente, por tejido conectivo (tc). La ausencia de reepitelización también se aprecia al analizar la región central de la herida, donde se observan los restos de la reacción de inflamación, en la zona superior (detalle: figura 18F), y el tejido de granulación, en la zona inferior.

Por lo tanto, parece claro que en el día 6 existe un retraso en la cicatrización de las heridas de los ratones haploinsuficientes. Este retraso se caracteriza por la ausencia de la capa de epidermis que delimita la costra y la persistencia, en cambio, de la respuesta inflamatoria característica de los primeros estadios de la cicatrización. De esta forma, mientras que las heridas de los ratones deficientes de endogлина se encuentran entre la fase inflamatoria y la fase proliferativa de la cicatrización, las heridas de los ratones controles estarían en una etapa más avanzada dentro de la fase proliferativa. Esto resulta muy interesante, ya que con el análisis macroscópico de las heridas estas diferencias entre ambos tipos de ratones a día 6 no se pueden apreciar.

Para identificar las zonas donde existe proliferación celular, realizamos una inmunohistoquímica en la que detectamos la **expresión del antígeno Ki67**, un marcador nuclear de proliferación celular. De esta forma, identificando los núcleos marcados podemos determinar las zonas de la herida con una mayor proliferación celular. Al analizar las heridas de los ratones *Eng<sup>+/+</sup>* encontramos queratinocitos dividiéndose en el epitelio proliferativo de los bordes de las heridas (Figura 19A, flechas) y proliferación celular en los tejidos de granulación de los bordes (Figura 19A) y el centro de la herida. También observamos queratinocitos proliferando en la capa de epidermis recién formada bajo la costra de la herida (Figura 19C).

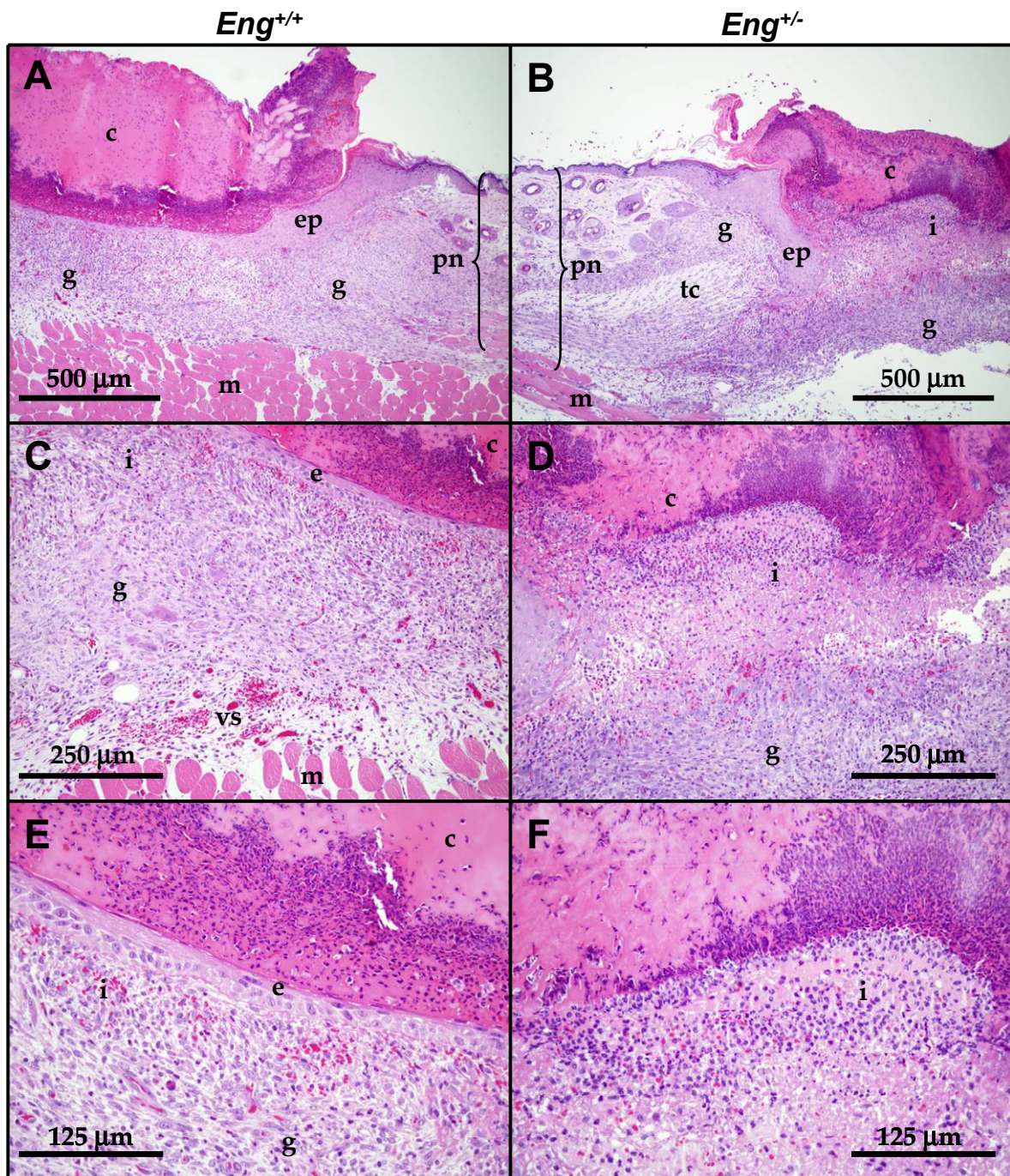
Presentan, por lo tanto, el patrón de proliferación normal para la fase de la cicatrización en la que se encuentran en el día 6. Cuando analizamos las heridas de los ratones *Eng<sup>+/-</sup>*, observamos que también presentan proliferación de queratinocitos en el epitelio proliferativo de los bordes de las heridas (Figura 19B, flechas), pero, sobre todo, se observa una importante proliferación celular en el tejido de granulación tanto del borde (Figura 19B) como de la zona central de la herida (Figura 19D). Aunque en las heridas de los ratones control también se observa proliferación en el tejido de granulación, el número de núcleos marcados es mucho mayor en los ratones haploinsuficientes de endoglina.

La síntesis de matriz extracelular es un proceso fundamental para la correcta cicatrización de las heridas, tal y como se detalla en la introducción de este trabajo. Quisimos analizar las posibles diferencias en la matriz extracelular presente en las heridas de los ratones haploinsuficientes transcurridos los primeros 6 días del proceso de cicatrización. Para ello, realizamos una **tinción con Rojo Sirio**, un colorante que tiñe específicamente la matriz extracelular. Cuando analizamos la tinción de las heridas de los ratones *Eng<sup>+/-</sup>*, observamos cómo la acumulación de matriz en la zona de la herida es mucho menor que en la dermis (d) de la piel normal (Figura 20A). Además, se observa cómo empieza a acumularse matriz extracelular en los bordes y en la parte inferior de la herida, coincidiendo con las zonas que identificamos como tejido de granulación (Figura 20C). En los ratones *Eng<sup>+/-</sup>* también detectamos menos matriz extracelular en la zona de la herida que en la dermis normal, sin embargo destacan los importantes acúmulos de matriz extracelular que aparecen en la parte inferior de los bordes de las heridas (Figura 20B). Estas zonas fibróticas se corresponden con el área de tejido conjuntivo que se observaba en la tinción con hematoxilina-eosina y que apenas se detecta en las heridas de los ratones *Eng<sup>+/-</sup>*. Además, observamos cómo, al igual que en las heridas de los ratones controles, se comienza a acumular matriz extracelular en las zonas que identificamos como tejido de granulación tanto en los bordes como en la parte inferior de la herida (Figura 20B y 20D).

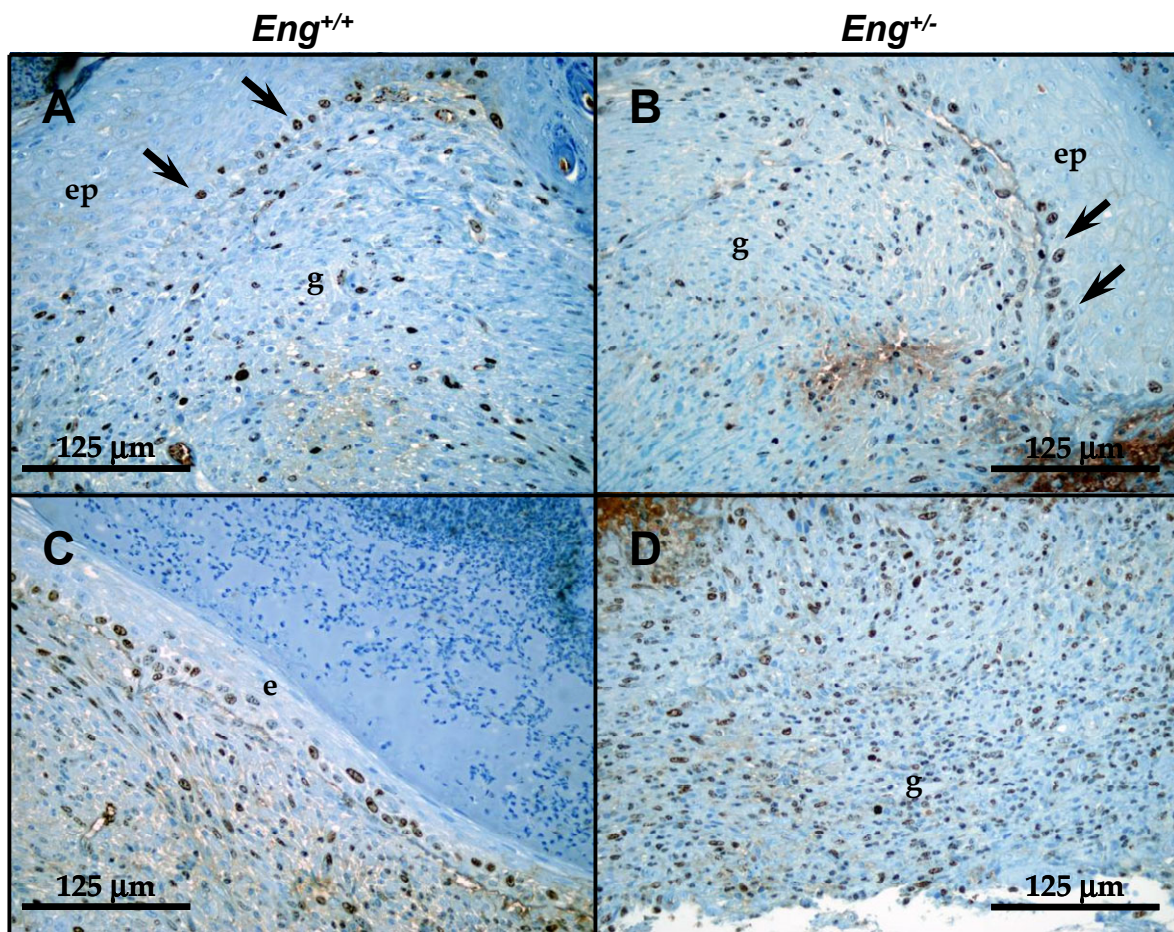
Estos resultados demuestran que existen diferencias importantes en el tejido de granulación de las heridas de estos ratones, ya que las heridas de los ratones *Eng<sup>+/-</sup>* presentan un tejido de granulación con mayor proliferación celular y acumulación de matriz extracelular según indican el marcaje del Ki67 y la tinción con Rojo Sirio. Como el tipo celular más importante del tejido de granulación son los fibroblastos y estos son los responsables de la síntesis de matriz en la herida, evaluamos las posibles diferencias en la presencia de fibroblastos activos, miofibroblastos, en la herida. Para ello, realizamos una inmunohistofluorescencia de  **$\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)**. En las heridas de los ratones controles observamos fluorescencia, principalmente, en el tejido de granulación de los bordes de la herida (Figura 21A). Sin embargo, la expresión de  $\alpha$ -SMA en las heridas de los ratones haploinsuficientes es mucho mayor que la de los ratones controles y no solo aparece en el tejido de granulación de los bordes de la herida, sino también en el tejido de granulación de la zona inferior de esta (Figura 21B). Al comparar los bordes de las heridas, se observa que las heridas de los ratones haploinsuficientes presentan un marcaje de  $\alpha$ -SMA mucho más fuerte que las de los ratones controles (Figura 21C y D).

Por lo tanto, a los 6 días de producirse la herida, los ratones *Eng<sup>+/-</sup>* tienen una cicatrización retrasada con respecto a los ratones *Eng<sup>+/+</sup>*. Por otro lado, su tejido de granulación tiene mayor proliferación celular, acumulación de matriz extracelular y activación de fibroblastos que las heridas de los ratones control.

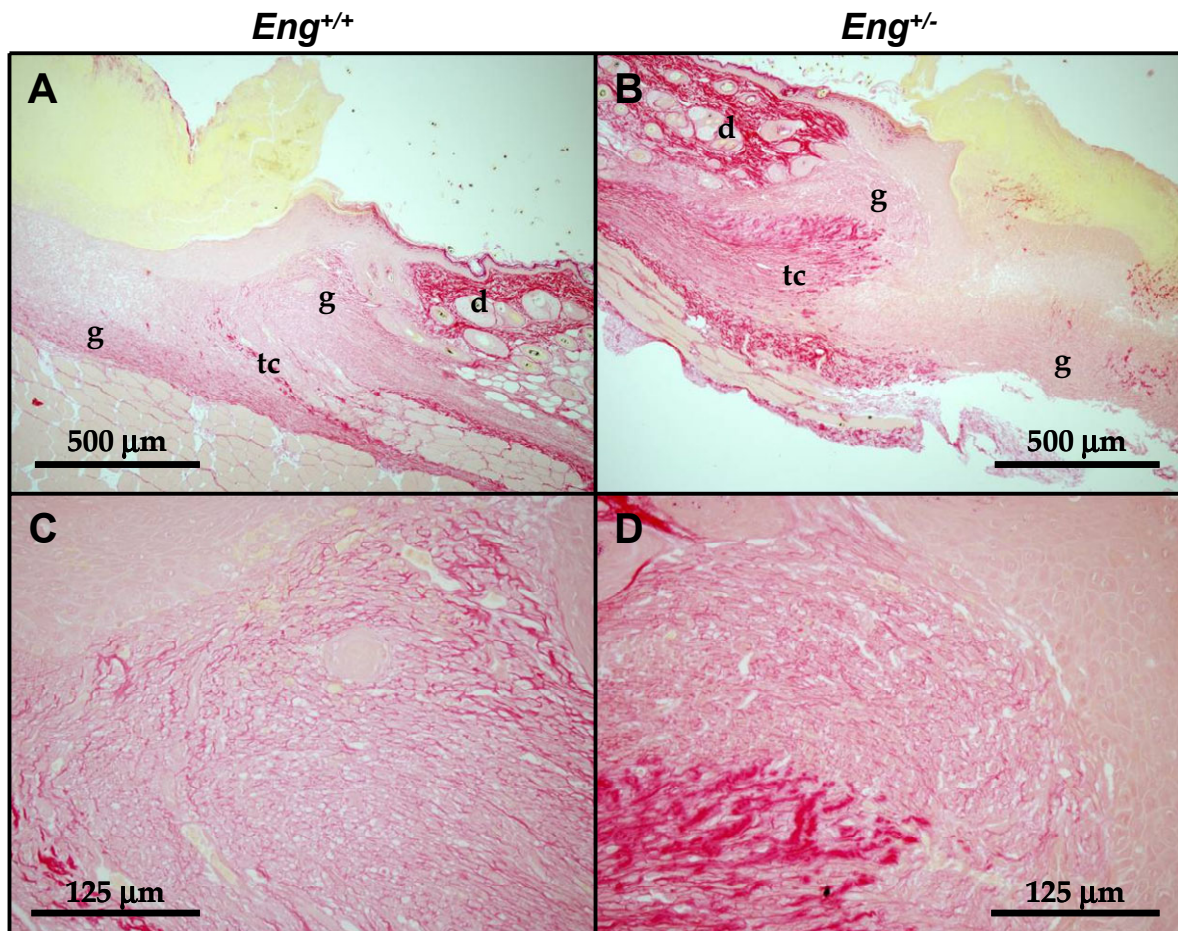




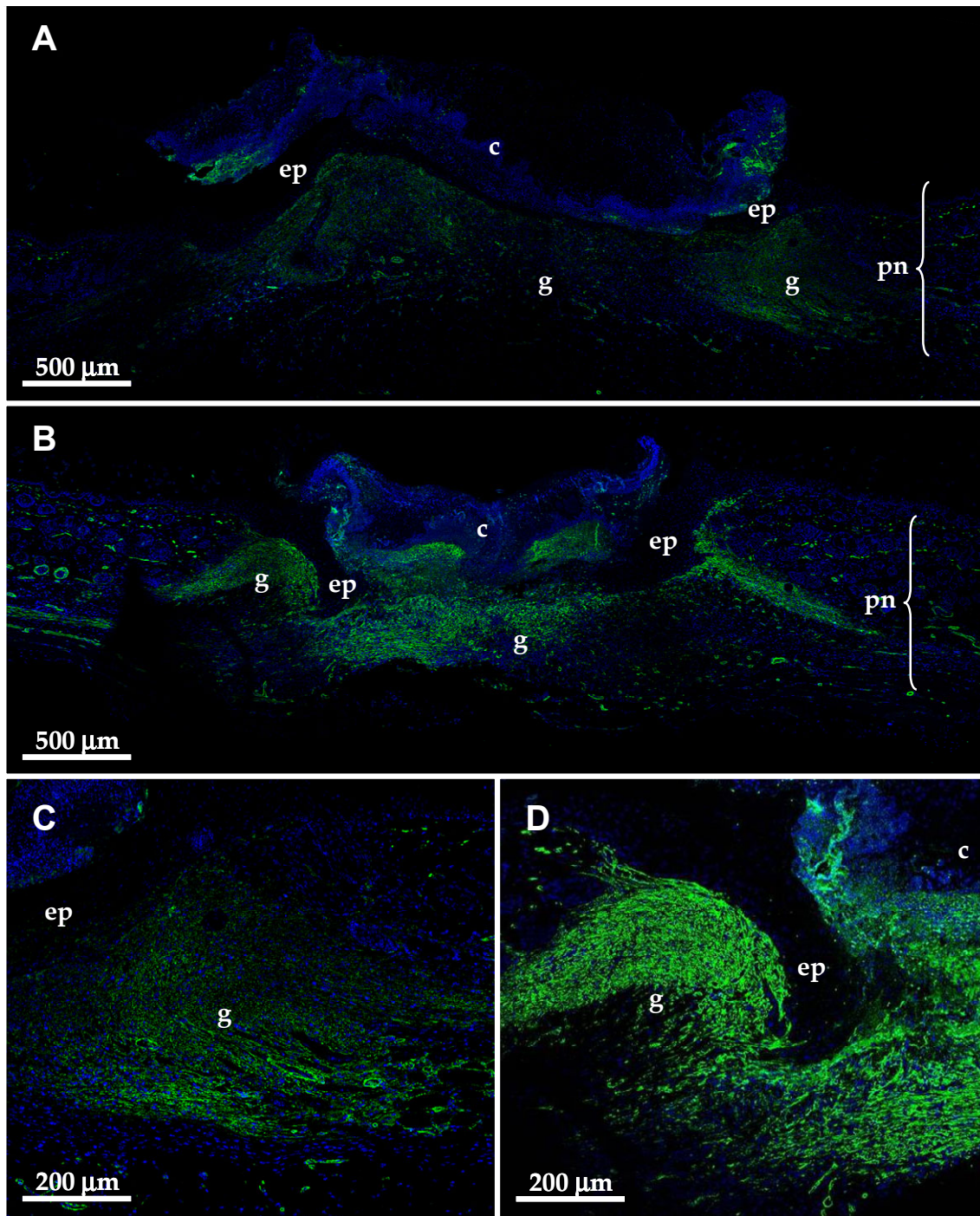
**Figura 18. Tinción con hematoxilina-eosina de heridas de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  en el día 6. (A-B)** Aspecto general de las heridas (Magnificación, 10x). En las heridas podemos diferenciar estructuras características como la costra (c), el epitelio proliferativo (ep) presente en los bordes de la herida y el tejido de granulación (g) tanto en la parte inferior de la herida como en los bordes. Además se observan la capa muscular (m) sobre la que está la herida y la piel normal (pn) que no ha sido dañada. Las heridas de los ratones  $Eng^{+/-}$  se caracterizan por la presencia de inflamación (i). Además, se diferencia una capa rica en tejido conectivo (tc). (C) En las heridas de ratones  $Eng^{+/+}$ , se ha formado ya una capa fina de epitelio (e) que separa la costra de los restos de la inflamación (i) y del tejido de granulación. En la parte inferior del tejido de granulación, se observan grupos de vasos sanguíneos (vs) que participan en la regeneración de la herida (Magnificación 20x). (D) En las heridas de ratones  $Eng^{+/-}$ , no se ha formado aún la capa de epitelio y en la zona aparece una importante reacción inflamatoria (Magnificación 20x). (E) Detalle de la capa de epitelio recién formada en las heridas  $Eng^{+/+}$  (Magnificación 40x). (F) Detalle de la inflamación en las heridas  $Eng^{+/-}$  (Magnificación 40x).



**Figura 19. Detección inmunohistoquímica del antígeno Ki67 en heridas de ratones *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> en el día 6. (A-B) Al analizar los bordes de la heridas, detectamos proliferación celular en la zona basal (flecha) del epitelio proliferativo (ep) y en el tejido de granulación (g) (Magnificación, 40x). (C) En la zona central de las heridas *Eng*<sup>+/+</sup> encontramos células proliferando en la capa basal del epitelio recién formado y en el tejido de granulación (Magnificación 40x). (D) Las heridas de los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> se caracterizan por la intensa proliferación celular en el tejido de granulación de la región central de la herida (Magnificación 40x).**



**Figura 20. Tinción con Rojo Sirio de heridas de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  en el día 6. (A-B)** Aspecto general de las heridas. La tinción con Rojo Sirio es mucho menor en la herida que en la dermis de la piel normal, que presenta una tinción más intensa y una disposición más organizada (Magnificación, 10x). **(A)** En la herida del ratón  $Eng^{+/+}$  se observa cómo las zonas con mayor tinción de Rojo Sirio son las que corresponden al tejido de granulación (g). En la zona inferior del borde de la herida, se aprecia una línea con mayor acumulación de tejido conectivo (tc). No se aprecia un marcaje importante en la zona de la epidermis. **(B)** En las heridas de los ratones  $Eng^{+/-}$ , al igual que en las heridas de los ratones control, se observa que la síntesis de matriz extracelular se produce principalmente en el tejido de granulación (g). Pero, además, hay que destacar los importantes acúmulos de tejido conectivo (tc) que se aprecian en la parte inferior del borde de la herida y que se prolongan hacia la piel normal. **(C-D)** La síntesis de matriz extracelular en el tejido de granulación del borde de las heridas parece mayor en las heridas  $Eng^{+/-}$  que en las heridas  $Eng^{+/+}$  (Magnificación, 40x).



**Figura 21. Detección de  $\alpha$ -SMA en las heridas de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  en el día 6.** Mediante inmunohistofluorescencia marcamos, con FITC, la expresión de  $\alpha$ -SMA y, con DAPI, los núcleos celulares. **(A)** En las heridas de los ratones  $Eng^{+/+}$  se detecta expresión de  $\alpha$ -SMA, principalmente, en el tejido de granulación (g) del borde de la herida. Por otro lado, se observa marcaje en la zona inferior de la herida que se corresponde con los vasos sanguíneos que se están formando (Magnificación 10x). **(B)** Las heridas de los ratones  $Eng^{+/-}$  tienen un marcaje mucho más importante que las heridas de los ratones control. Además, este marcaje aparece tanto en el tejido de granulación (g) del borde de la herida como en el de la parte inferior de la herida. También se aprecian, igual que en la imagen de la herida control, los miofibroblastos residentes de la piel normal (Magnificación, 10x). **(C-D)** Detalle de los bordes de las heridas en las que se aprecia que las heridas de los ratones haploinsuficientes presentan mayor marcaje (Magnificación, 20x).

### 1.2.2. Análisis histológico de las heridas en el día 12

Una vez analizadas las diferencias que presentan las heridas de los ratones haploinsuficientes en endogлина en la mitad del proceso de cicatrización, evaluamos si en el día 12, en el que la mayoría de las heridas están cerradas, se pueden encontrar diferencias histológicas entre las cicatrices de ambos tipos de ratón. De nuevo, comenzamos realizando una **tinción con hematoxilina-eosina**. Las cicatrices de ambos tipos de ratones presentan una epidermis engrosada respecto a la piel que rodea la cicatriz y una dermis compuesta, principalmente, por tejido conjuntivo y fibroblastos, en la que destaca la ausencia de estructuras anejas que, en todo caso, comienzan a formarse (Figura 22). En las cicatrices de los ratones haploinsuficientes, en algunos casos, aún quedan restos de costra, pero se puede observar cómo ya se ha formado completamente la capa de epidermis debajo de ella (Figura 22B). Al analizar la proliferación celular mediante inmunohistoquímica del **antígeno Ki67**, observamos cómo, en las cicatrices de los ratones *Eng<sup>+/+</sup>*, se aprecia proliferación celular en la capa basal de la epidermis, en los folículos pilosos que se están formando y apenas aparecen células en proliferación en la dermis de la cicatriz (Figura 23A). Sin embargo, las cicatrices de los ratones haploinsuficientes sí presentan grupos de células proliferantes en la zona más inmadura de la dermis, además de en la base de la epidermis y en los folículos pilosos que se están regenerando (Figura 23B). Estudiamos también la estructura de la matriz extracelular en las cicatrices de los ratones *Eng<sup>+/+</sup>* y *Eng<sup>+/-</sup>* mediante la **tinción con Rojo Sirio**. En ambos casos, se observa que la dermis de la cicatriz está compuesta, principalmente, por matriz extracelular y cómo, especialmente la dermis profunda, comienza a estructurarse en haces paralelos a la epidermis (Figura 24). Sin embargo, este proceso parece más avanzado en las cicatrices de los ratones control (Figura 24A y C) que en las de los ratones haploinsuficientes, cuya dermis parece más desorganizada y presenta mayores acúmulos de matriz extracelular (Figura 24B y D). La **expresión de  $\alpha$ -SMA** en las cicatrices de los ratones *Eng<sup>+/+</sup>* se limita a unos pocos miofibroblastos (Figura 25A) mientras que en las cicatrices de los ratones *Eng<sup>+/-</sup>* aún aparecen importantes poblaciones de miofibroblastos en el área de la herida (Figura 25B).

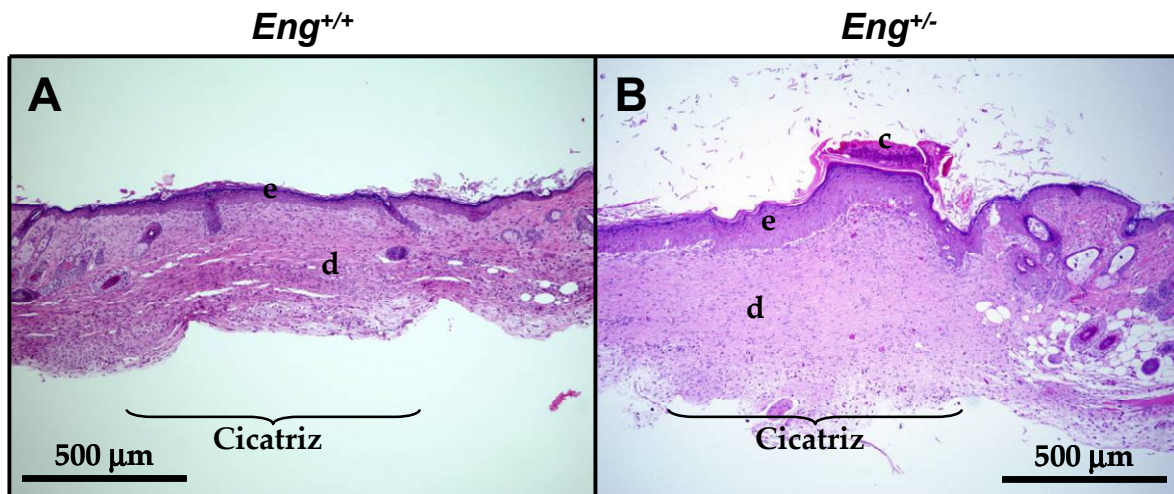


Figura 22. Tinción con hematoxilina-eosina de heridas de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  en el día 12. (A-B) Aspecto general de las cicatrices de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  (Magnificación, 10x). Diferenciamos la zona de la cicatriz de la piel normal por la ausencia de estructuras anejas. La cicatrices presentan una epidermis (e) y una dermis (d) completamente formadas, aunque en las heridas  $Eng^{+/-}$  aún se pueden encontrar restos de la costra (c).

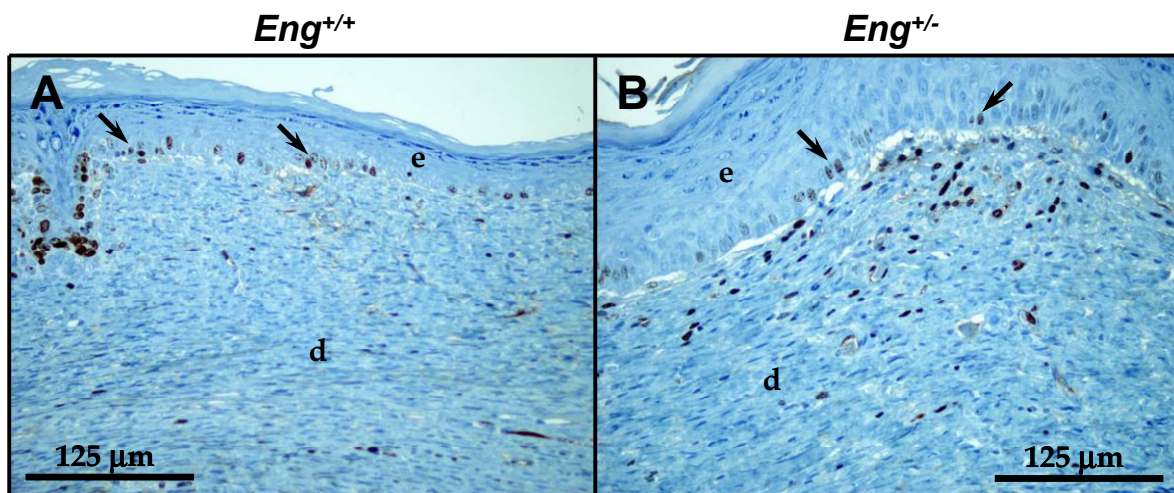
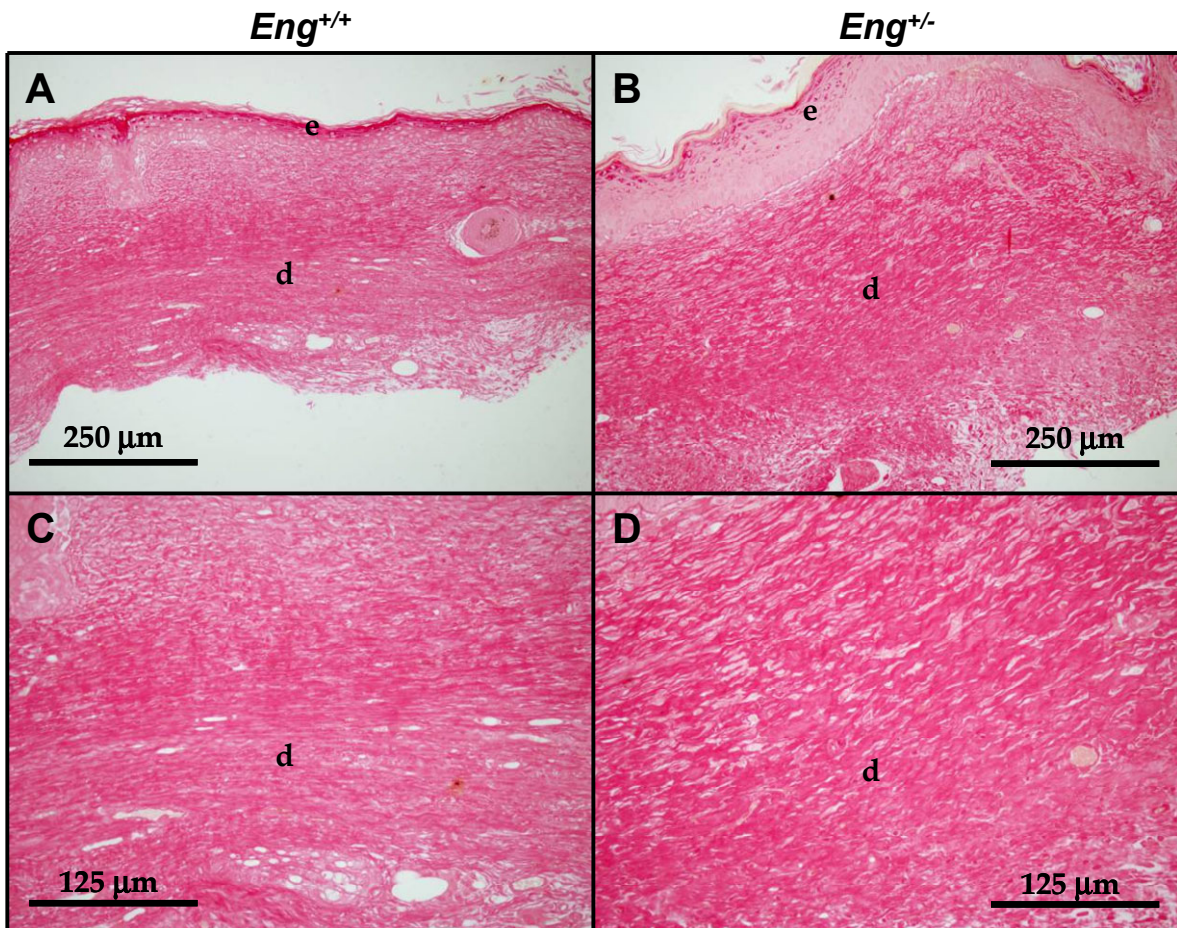
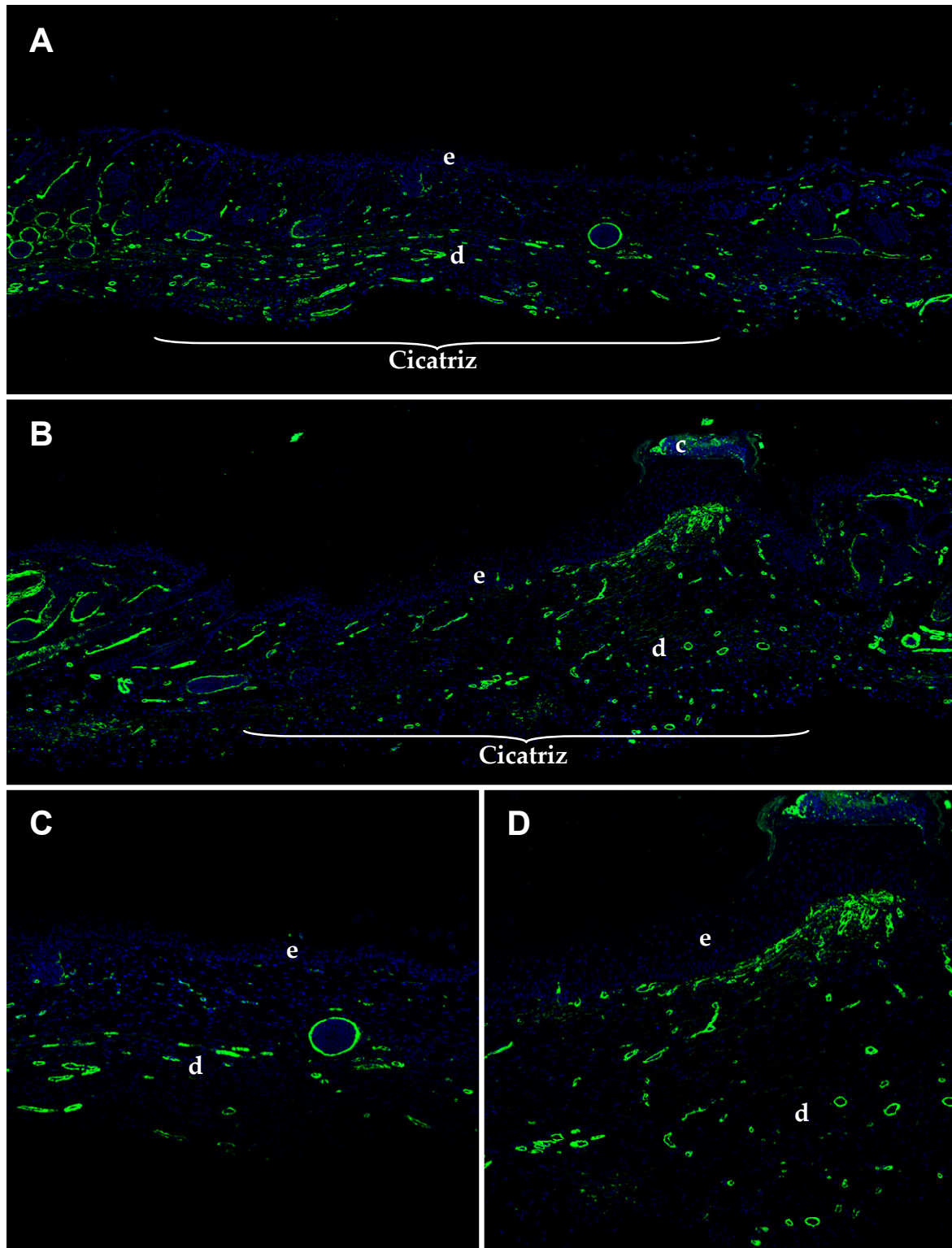


Figura 23. Detección inmunohistoquímica del antígeno Ki67 en heridas de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  en el día 12. (A) Al analizar la cicatriz de un ratón  $Eng^{+/+}$ , detectamos proliferación celular en la zona basal (flechas) de la epidermis (ep), pero apenas observamos núcleos proliferando en la dermis (d) (Magnificación, 40x). (B) Las cicatrices de los ratones  $Eng^{+/-}$  presentan, además del marcaje de la zona basal de la epidermis (flechas), numerosas células proliferando en la dermis de la cicatriz (Magnificación 40x).



**Figura 24. Tinción con Rojo Sirio de heridas de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  en el día 12. (A-B) Aspecto general de las cicatrices. En este día se observa una tinción más importante y una disposición bien organizada (Magnificación, 20x). (C-D) Al analizar en profundidad la estructura de la dermis de las cicatrices, se observa que la cicatriz de los ratones  $Eng^{+/+}$  está más estructurada de forma paralela a la epidermis. Sin embargo, las cicatrices de los ratones  $Eng^{+/-}$ , presentan mayores acúmulos de colágeno en una apariencia más desestructurada (Magnificación, 40x).**



**Figura 25. Detección de  $\alpha$ -SMA en las heridas de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  en el día 12.** Mediante inmunohistofluorescencia marcamos, con FITC, la expresión de  $\alpha$ -SMA y, con DAPI, los núcleos celulares. **(A)** En las cicatrices de los ratones  $Eng^{+/+}$  se detecta expresión de  $\alpha$ -SMA en la dermis profunda. Este marcaje puede deberse a la detección del músculo liso de los vasos sanguíneos que irrigan la piel. Se observan, también, algunos miofibroblastos en la zona más superficial de la dermis (Magnificación, 10x). **(B)** En las cicatrices de los ratones  $Eng^{+/-}$  también se observa marcaje en la dermis profunda. Sin embargo, en estas cicatrices existe un marcaje mucho más importante en la dermis superficial (Magnificación, 10x). **(C-D)** Detalle de las cicatrices (Magnificación, 20x).



El análisis macroscópico de la cicatrización a lo largo de los días revela que, en los primeros días, existe un retraso en los animales haploinsuficientes, sin embargo, esas diferencias iniciales van desapareciendo a lo largo de los días. En cuanto al cierre final de la herida, se observa un leve retraso en los ratones *Eng<sup>+/-</sup>*. Estas diferencias, que *a priori* no parecen excesivamente importantes, se hacen más evidentes en cuanto llevamos a cabo un análisis histológico de las heridas. En el día 6, cuando macroscópicamente no se observan diferencias significativas, las heridas de los ratones haploinsuficientes presentan un importante retraso en la cicatrización. Además, en el día 12, cuando el estudio macroscópico parece revelar un leve retraso en la cicatrización de las heridas en ratones *Eng<sup>+/-</sup>*, el análisis histológico revela que en ambos tipos de heridas se ha completado la reepitelización, por lo que se ha cumplido el primer objetivo de la cicatrización, que es la regeneración de la barrera epitelial. De esta forma, la primera evidencia que se puede extraer de nuestros resultados es que el análisis histológico de la secuencia de eventos que tienen lugar en la cicatrización es imprescindible para intentar estudiar este proceso. Recientemente, se ha propuesto una metodología, basada en el estudio macroscópico de la cicatrización combinado con un análisis histológico, que permite un análisis más preciso del efecto de diferentes factores sobre la cicatrización (Braiman-Wiksmann *et al.*, 2007). Solo llevando a cabo un análisis histológico de la cicatrización podemos determinar qué proceso se encuentra alterado en nuestro estudio.

En los ratones *Eng<sup>+/-</sup>*, el primer proceso afectado podría ser la reacción inflamatoria que tiene lugar tras la aparición de la herida. La persistencia del infiltrado inflamatorio y la ausencia de reepitelización en las heridas de los ratones *Eng<sup>+/-</sup>*, después de 6 días, podrían indicar que se ha producido un retraso en las primeras etapas de la cicatrización. El primer evento que tiene lugar tras la formación del coágulo es la aparición de las células del sistema inmune (neutrófilos y, más tarde, macrófagos) que depende de la vasodilatación de los vasos que irrigan la zona dañada. Nuestro grupo ha demostrado que los ratones haploinsuficientes de endogлина presentan alteraciones en la vasodilatación al tener una síntesis deficiente de óxido nítrico (Jerkic *et al.*, 2004), por lo que es posible que los ratones *Eng<sup>+/-</sup>*

presenten deficiencias en la aparición de la reacción inflamatoria. Además, para la formación del tejido de granulación, es imprescindible la formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigen la zona y permitan la llegada de más células del sistema inmune a la herida. Nosotros hemos demostrado que los ratones haploinsuficientes tienen una angiogénesis deficiente (Jerkic *et al.*, 2006b), por lo que esta angiogénesis deficiente podría estar causando también el retraso en la cicatrización que observamos en las heridas de los ratones *Eng*<sup>+/-</sup>. En este sentido, con la hematoxilina-eosina podemos detectar la presencia de vasos sanguíneos en la parte inferior de las heridas de los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> que no se observan en los *Eng*<sup>+/-</sup>. Además, al recoger el tejido para realizar el análisis histológico, observamos que las heridas de los ratones haploinsuficientes presentaban menor infiltración de vasos desde el músculo que las de los ratones control (datos no mostrados). Por lo tanto, alteraciones en estos procesos pueden ser las causantes del retraso que presentan los ratones haploinsuficientes en los primeros días de la cicatrización.

El análisis histológico de las heridas reveló más alteraciones en la cicatrización causadas por la deficiencia de endogлина. En primer lugar, en el día 6 hay un marcado incremento de la proliferación en el tejido de granulación de las heridas de ratones *Eng*<sup>+/-</sup>. Además, la tinción con Rojo Sirio parece apuntar que los ratones haploinsuficientes sintetizan más matriz extracelular que los controles. Estos dos resultados nos llevaron a estudiar la expresión del marcador de miofibroblastos,  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), en las heridas en el día 6. Las heridas de los ratones haploinsuficientes presentan un marcaje mucho mayor que las heridas control. Este marcaje se encuentra localizado en el tejido de granulación de los bordes y de la zona central de la herida. En cambio, las heridas de ratones control solo parecen presentar marcaje en los bordes de la herida, aunque se observan estructuras positivas en la zona basal de la herida que parecen corresponderse con los vasos sanguíneos que se están formando en esa zona. Estos resultados indican que la deficiencia de endogлина provoca la aparición de más miofibroblastos en la zona de la herida. Además, después de 12 días estos permanecen en la cicatriz formada, que parece más fibrótica e inmadura.

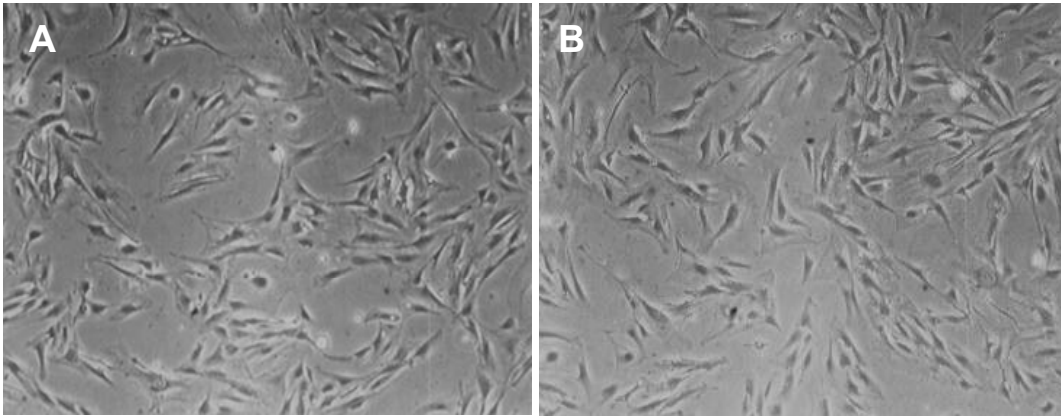
Los miofibroblastos, la forma diferenciada y activa de los fibroblastos, participan en la contracción de la herida y en el remodelado de la matriz, por lo que durante mucho tiempo se les ha considerado imprescindibles para la cicatrización (Grinnell, 1994). Sin embargo, diferentes estudios demuestran que los miofibroblastos no son necesarios para que tenga lugar la cicatrización completa de la herida (Ehrlich *et al.*, 1999) y, además, relacionan la presencia de miofibroblastos en la herida con la formación de cicatrices hipertróficas (Ehrlich *et al.*, 1994). Una de las moléculas responsables de este proceso parece ser TGF $\beta$ 1. Se ha demostrado que el tratamiento con TGF $\beta$ 1 provoca la aparición de cicatrices mientras que el tratamiento con inhibidores de TGF $\beta$ 1 favorece la regeneración de la piel. Además, las heridas de embriones, que expresan TGF $\beta$ 3 en lugar de TGF $\beta$ 1, regeneran sin formar cicatriz (Ferguson y O'Kane, 2004; Werner y Grose, 2003). TGF $\beta$ 1 es también uno de los factores responsables de la activación de los fibroblastos a miofibroblastos (Desmouliere *et al.*, 1993; Hinz, 2007). Como diferentes autores han propuesto que endogлина tiene un papel modulador de la acción de TGF $\beta$ 1 en diferentes tipos celulares (Diez-Marques *et al.*, 2002; Lastres *et al.*, 1996; Letamendia *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000b; Rodriguez-Barbero *et al.*, 2006), es posible que la deficiencia de endogлина potencie el efecto de TGF $\beta$ 1 en la herida. Esto daría lugar a la formación de cicatrices más inmaduras y engrosadas, posiblemente como consecuencia de la acumulación de poblaciones de miofibroblastos en la herida.

Pero los miofibroblastos no solo son interesantes en el desarrollo de la regeneración de heridas. También participan en la reacción estromal en el cáncer (Desmouliere *et al.*, 2004) y están implicados en el desarrollo de numerosas patologías relacionadas con la fibrosis (McAnulty, 2007). Por todo esto, el estudio del papel de endogлина en la aparición y acumulación de los miofibroblastos puede tener importantes implicaciones terapéuticas más allá de la regulación de la cicatrización.

## 2. Generación de un modelo de fibroblastos de piel deficientes de endogлина

Los fibroblastos son células fundamentales en los procesos de reparación ya que son las células responsables de la formación de la primera matriz que rellena la herida, de la contracción de la misma y del remodelado final que devuelve la elasticidad a la zona dañada. Alteraciones sobre ciertas funciones esenciales de los fibroblastos de piel, como pueden ser la proliferación, la migración o la formación de matriz extracelular, dan lugar a modificaciones importantes en la cicatrización. La modificación de las propiedades celulares debida a una mayor o menor expresión de endogлина ha sido descrita en diferentes trabajos (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999; Lastres *et al.*, 1996; Obreo *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2008). Además, se ha descrito cómo la haploinsuficiencia de endogлина también modifica las propiedades de células endoteliales de cultivo primario (Jerkic *et al.*, 2006b).

Para evaluar si la haploinsuficiencia de endogлина modifica las propiedades biológicas de los fibroblastos implicadas en la cicatrización, decidimos generar cultivos primarios de fibroblastos de piel de ratón (MDF) a partir de la dermis de ratones *Eng<sup>+/+</sup>* y *Eng<sup>+/-</sup>*. Desarrollamos, a partir de un protocolo ya publicado (Bradshaw *et al.*, 1999), un método mediante el cual obtuvimos cultivos homogéneos de células con morfología fusiforme, característica de los fibroblastos en cultivo. Al analizar los cultivos obtenidos con un microscopio de contraste de fases no observamos diferencias importantes, ni en el tamaño ni en la morfología celular, entre las células procedentes de ratones haploinsuficientes de endogлина y las procedentes de los controles (Figura 26).



**Figura 26. Morfología de las células procedentes de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ .** Realizamos microfotografías de las células procedentes de ratones  $Eng^{+/+}$  (A) y  $Eng^{+/-}$  (B) en pase 4 con un microscopio de contraste de fases (Magnificación, 40x).

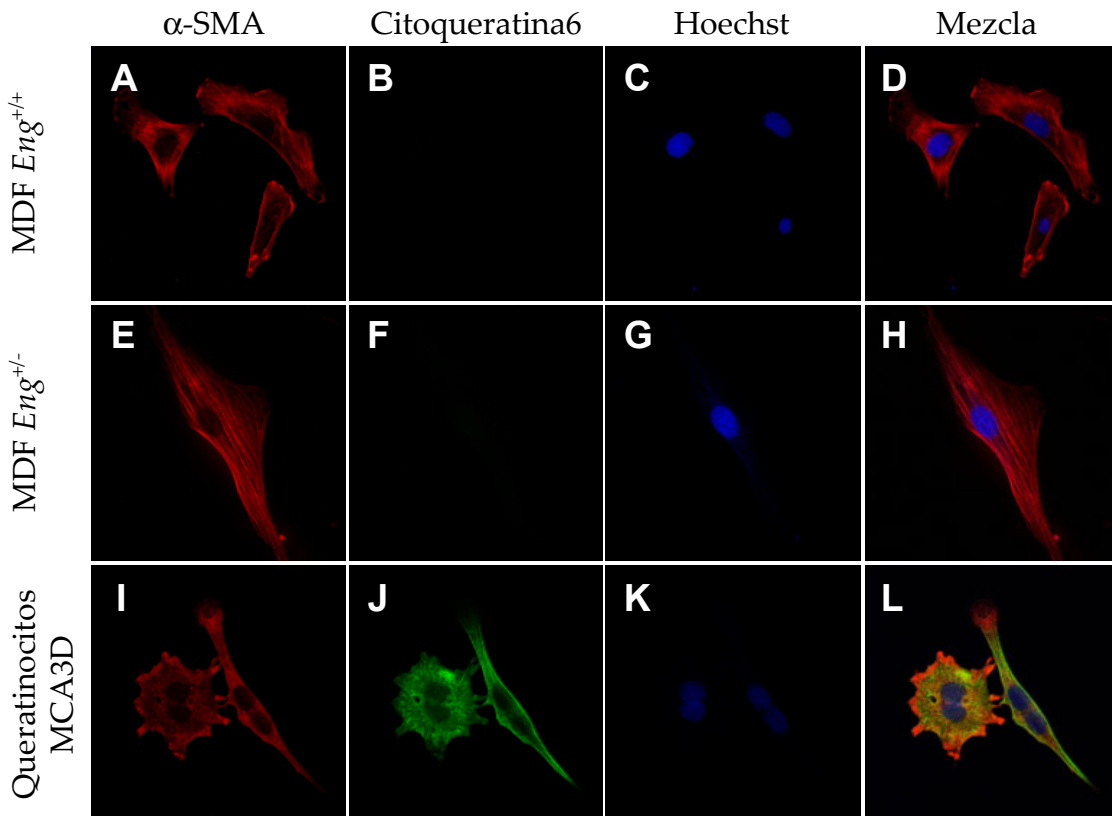
## 2.1. Caracterización del cultivo

Al haber obtenido un cultivo homogéneo de células fusiformes, en principio, ya habríamos eliminado las posibles células contaminantes del cultivo. Sin embargo, quisimos asegurarnos de que no teníamos contaminación del otro tipo celular más abundante en la piel, los queratinocitos. Para ello analizamos mediante inmunofluorescencia la expresión de citoqueratina 6 y de  $\alpha$ -SMA.

Citoqueratina 6 es una proteína que expresan los queratinocitos en situaciones de alta proliferación celular como pueden ser algunos procesos fisiopatológicos, como la reparación de heridas, o el cultivo de células *in vitro* (Tyner y Fuchs, 1986). Por lo tanto, utilizamos este marcador para estudiar la presencia de queratinocitos en el cultivo. Como marcador positivo utilizamos la línea de queratinocitos MCA3D (Kulesz-Martin *et al.*, 1983; Quintanilla *et al.*, 1991) cedida amablemente por el Dr. Miguel Quintanilla.

Los miofibroblastos son una forma diferenciada y activa de los fibroblastos con mayor capacidad sintética y migratoria que los fibroblastos residentes. En cultivos *in vitro*, el fenotipo más estable de los fibroblastos es el de “protomiofibroblasto”, un paso intermedio en la diferenciación hacia miofibroblastos, que se caracteriza por la expresión *de novo* de  $\alpha$ -SMA. Por esta razón,  $\alpha$ -SMA se suele emplear como marcador de fibroblastos en cultivo (Hinz *et al.*, 2007).

Tanto los fibroblastos obtenidos a partir de ratones haploinsuficientes como los controles presentaban una clara expresión de  $\alpha$ -SMA sin que aparecieran células positivas para citoqueratina 6 en el cultivo. La disposición de la  $\alpha$ -SMA era, en ambos casos, en forma de fibras de estrés. Como cabía esperar, en la línea de queratinocitos MCA3D sí que encontramos expresión de citoqueratina 6 (Figura 27).

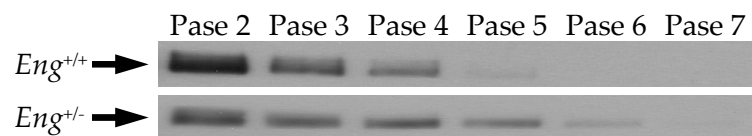


**Figura 27.** Expresión de  $\alpha$ -Actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y citoqueratina 6 en MDF. Realizamos una inmunofluorescencia indirecta, con un anticuerpo anti- $\alpha$ -SMA y con otro anti-citoqueratina 6, en MDF obtenidos de ratones  $Eng^{+/+}$  (A-D) y  $Eng^{+/-}$  (E-H). Como control positivo de la expresión de citoqueratina 6, utilizamos células de la línea de queratinocitos MCA3D (I-L). Las microfotografías se tomaron con un microscopio confocal (x630 aumentos).

## 2.2. Expresión de endogлина en los fibroblastos de dermis

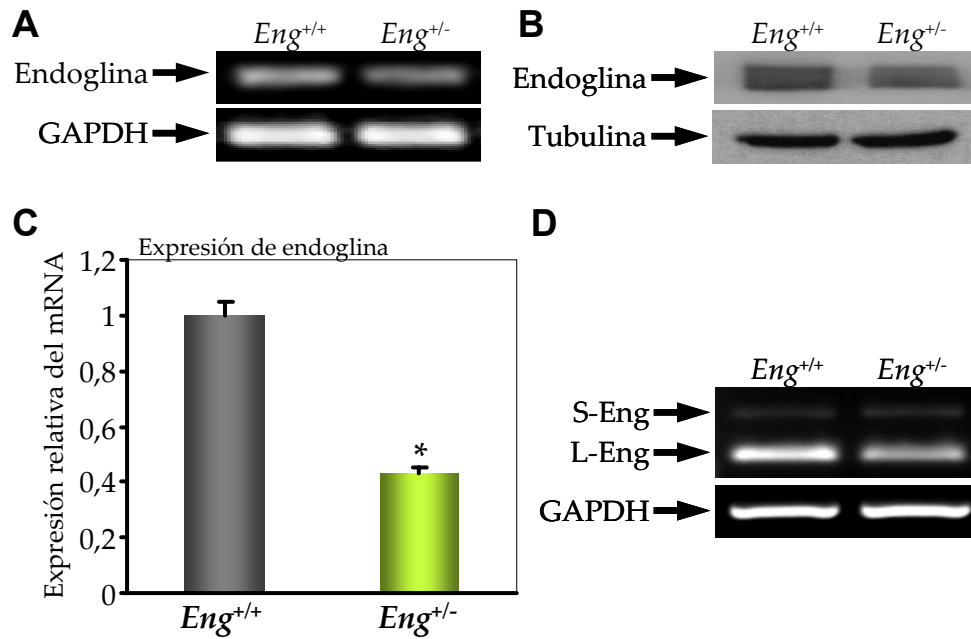
Una vez obtenidos los cultivos de fibroblastos, comprobamos la expresión de endogлина en los fibroblastos de dermis y si hay una diferente expresión de endogлина en los fibroblastos procedentes de los ratones *Eng<sup>+/-</sup>* con respecto a los procedentes de ratones *Eng<sup>+/+</sup>*.

Comprobamos, mediante *Western blot*, que los fibroblastos de cultivo primario obtenidos de la dermis de ratones expresan endogлина, pero que esta expresión va desapareciendo con los pases (Figura 28). Como esto ocurre tanto en los fibroblastos procedentes de ratones haploinsuficientes como en los controles, decidimos trabajar en el pase más bajo posible. Por lo tanto, teniendo en cuenta las limitaciones del cultivo, el pase en el que se han llevado a cabo todos los experimentos de este trabajo ha sido pase 4.



**Figura 28. Análisis de la expresión de endogлина a lo largo de sucesivos pases.** Analizamos la expresión de endogлина en MDF, procedentes de ratones deficientes en endogлина (*Eng<sup>+/-</sup>*) y sus respectivos controles (*Eng<sup>+/+</sup>*), a lo largo de los pases mediante *Western Blot*.

Analizamos la expresión de endogлина en los MDF *Eng<sup>+/+</sup>* y los *Eng<sup>+/-</sup>* mediante RT-PCR y *Western blot*. Los fibroblastos procedentes de ratones haploinsuficientes de endogлина poseen menores niveles de expresión, tanto del mRNA como de la proteína, de endogлина (Figura 29A y 29B, respectivamente). Para poder cuantificar esas diferencias, realizamos PCR cuantitativa y observamos que los MDF *Eng<sup>+/-</sup>* presentan aproximadamente la mitad de mRNA de endogлина que los *Eng<sup>+/+</sup>* (Figura 29C).



**Figura 29. Expresión de endoglina en MDF.** (A-B) Analizamos la expresión de endoglina en MDF procedentes de ratones deficientes en endoglina (*Eng*<sup>+/-</sup>) y sus respectivos controles (*Eng*<sup>+/+</sup>), mediante RT-PCR (A) o *Western Blot* (B). Como control de carga, analizamos la expresión de GAPDH y tubulina respectivamente. (C) Cuantificamos la diferente expresión de endoglina mediante PCR cuantitativa. (D) Analizamos la expresión de las isoformas corta y larga de endoglina mediante PCR.

Recientemente, se ha demostrado que los efectos de la expresión de endoglina sobre diferentes propiedades biológicas pueden depender de la isoforma de endoglina mayoritaria en la célula (Blanco *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 2008). Por ello analizamos, mediante RT-PCR, la expresión relativa de las isoformas L- y S-endoglina en nuestro modelo celular. Observamos que, aunque detectamos pequeños niveles de S-endoglina, la isoforma mayoritaria en nuestro modelo celular es la L-endoglina (Figura 29D).

Con los resultados mostrados hasta este punto, hemos demostrado que los fibroblastos de cultivo primario de dermis de ratón expresan endoglina. Además, los fibroblastos procedentes de ratones haploinsuficientes presentan una expresión deficiente de endoglina, aproximadamente la mitad, con respecto a los ratones control. Y, por último, que en nuestro modelo celular L-endoglina es la isoforma predominante aunque existe una pequeña expresión de S-endoglina.



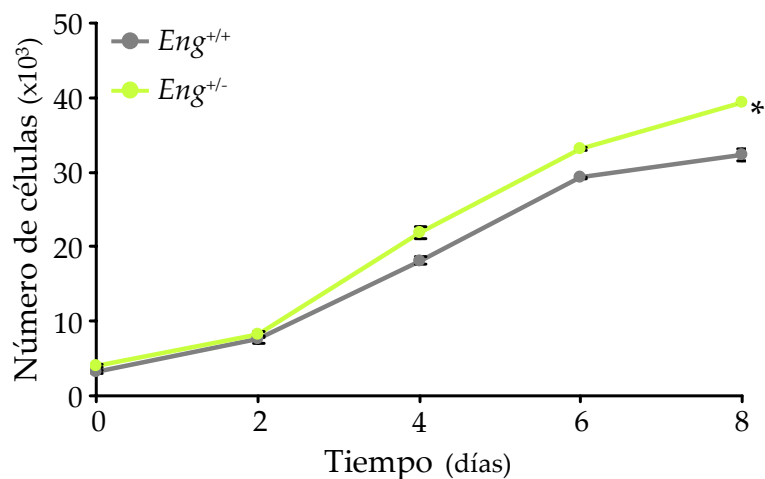
### 3. Efecto de endogлина sobre las propiedades celulares de los fibroblastos de piel

Tras comprobar que los fibroblastos de piel obtenidos de la dermis de ratones *Eng<sup>+/-</sup>* expresaban menos endogлина que los controles, decidimos investigar si esa diferente expresión de endogлина modificaba en algún sentido ciertas propiedades biológicas de los fibroblastos relacionadas con la cicatrización. Por ello analizamos el efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la proliferación, la migración y la síntesis de matriz extracelular de los MDF.

#### 3.1. Efecto de endogлина sobre la proliferación celular de los MDF

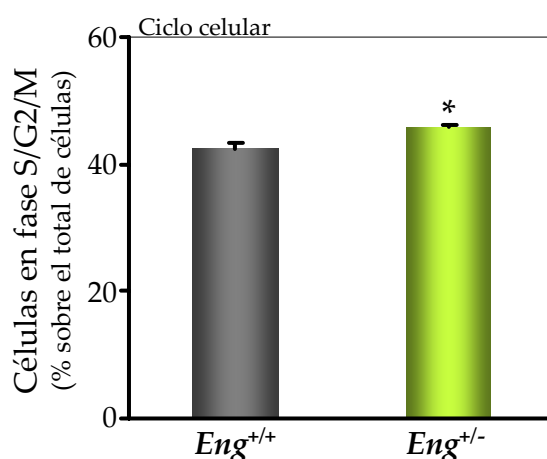
La proliferación de los fibroblastos es fundamental para la formación del tejido de granulación que se encarga de regenerar la matriz extracelular en la zona de la herida, por lo que modificaciones en la proliferación pueden dar lugar a alteraciones en la cicatrización. Por lo tanto, en primer lugar, estudiamos si la expresión de endogлина afecta a la proliferación de los fibroblastos. Para ello empleamos diferentes técnicas como la estimación del número de células por tinción con cristal violeta, el análisis del perfil de ciclo celular, el nivel de expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) o la técnica del MTT.

La técnica colorimétrica del cristal violeta nos permite, mediante la tinción de núcleos, estimar el número de células. De esta forma, podemos estudiar como se incrementa el número de células en cultivo a lo largo de 8 días hasta obtener una curva de proliferación. Las células deficientes de endogлина proliferan más que las controles ya que, partiendo del mismo número de células, después de 8 días hay significativamente más células *Eng<sup>+/-</sup>* que *Eng<sup>+/+</sup>* (Figura 30).



**Figura 30. Curvas de proliferación de MDF  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ .** Medimos, mediante la técnica del cristal violeta, el número de células presentes en cada pocillo en los días indicados. La gráfica corresponde a un experimento representativo de 3 experimentos realizados. Se representa la media  $\pm$  EEM ( $n=4$  pocillos). \*  $p<0,05$  vs curva  $Eng^{+/+}$ .

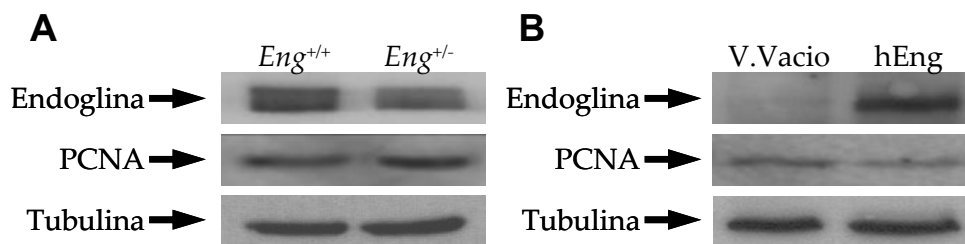
Analizamos, mediante citometría de flujo, el perfil del ciclo celular en los MDF. Para ello, teñimos el DNA de los fibroblastos con yoduro de propidio y determinamos la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células en función de la cantidad de fluorescencia medida en el citómetro. El porcentaje de células que se encuentran en las fases S/G2/M es significativamente mayor en los MDF  $Eng^{+/-}$  ( $45,9 \pm 0,4\%$ ) que en los  $Eng^{+/+}$  ( $42,5 \pm 0,9\%$ ) (Figura 31).



**Figura 31. Perfil de ciclo celular de los MDF  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ .** Analizamos, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células en fase G0/G1, S y G2/M. Se representa la media+EEM del porcentaje de células en fase S/G2/M ( $n=3$ ). \*  $p<0,05$  vs  $Eng^{+/+}$ .

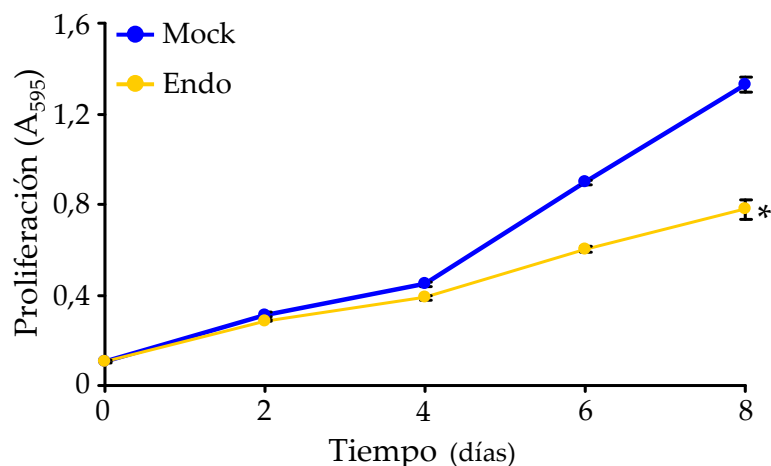
PCNA es un cofactor de la DNA polimerasa  $\delta$ , necesario para la replicación del DNA, que se sintetiza durante la transición entre las fases G1/S del ciclo celular (Bravo *et al.*, 1987). Por esta razón, es posible asociar los niveles de expresión de PCNA con el estado proliferativo de la célula. El estudio de la expresión de PCNA por *Western blot* mostró que hay una mayor expresión de este marcador en las células deficientes en endoglina con respecto a las controles (Figura 32A). Esto confirma los resultados obtenidos con la técnica del cristal violeta y al analizar el perfil de ciclo celular de estas células.

Para corroborar que las diferencias en la proliferación de los MDF se debían directamente a la expresión de endoglina, transfectamos de forma transitoria los fibroblastos con endoglina humana (hEng) y analizamos la expresión de PCNA. Las células transfectadas con hEng tienen una menor expresión de PCNA que las transfectadas con el vector vacío (Figura 32B).



**Figura 32. Expresión de PCNA en MDF en función de la cantidad de endoglina.** Analizamos, mediante *Western blot*, la expresión de PCNA en MDF deficientes de endoglina y sus controles (A) o en MDF controles transfectados con endoglina humana (hEng) o el vector vacío (B). Como control de carga, analizamos la expresión de GAPDH y tubulina respectivamente. Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos.

Además, analizamos, mediante ensayos con MTT, la proliferación celular de fibroblastos NIH3T3 infectados de manera estable con un vector de expresión de endoglina (Endo) o con el vector vacío (Mock). De manera similar a los resultados descritos anteriormente, encontramos que las células infectadas con endoglina proliferan menos que las infectadas con el vector vacío (Figura 33).



**Figura 33. Curvas de proliferación de fibroblastos NIH3T3 infectados con endoglina.** Evaluamos, mediante MTT, la proliferación celular de los fibroblastos infectados con endoglina humana o con el vector vacío a lo largo de los días indicados. La gráfica corresponde a un experimento representativo de 3 experimentos realizados. Se representa la media  $\pm$  EEM (n=4 pocillos). \*  $p < 0,05$  vs curva Mock.

El conjunto de nuestros resultados demuestra que hay una relación inversa entre la expresión de endoglina y la proliferación de los MDF ya que la expresión de endoglina en los fibroblastos inhibe la proliferación celular.

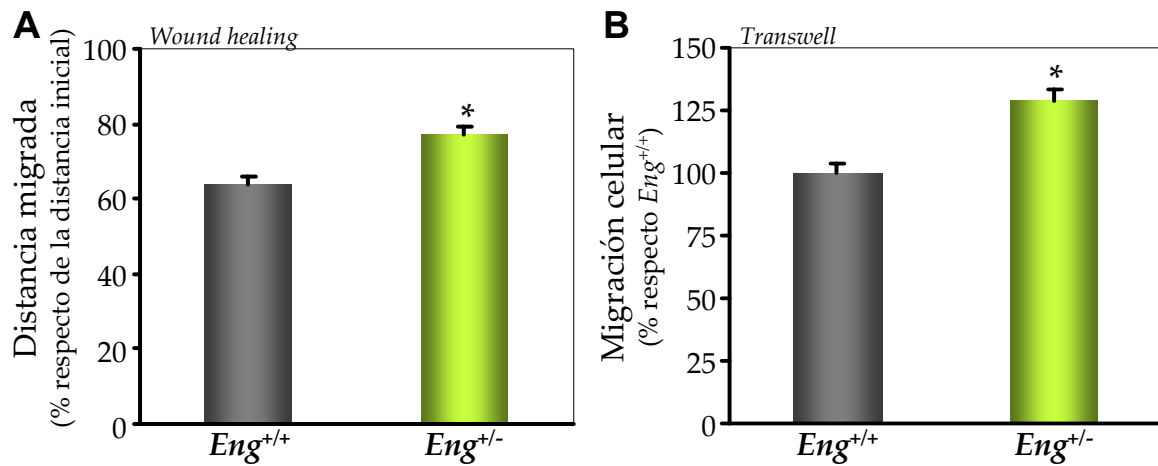
### 3.2. Efecto de endoglina sobre la migración celular de los MDF

Quisimos estudiar si la migración celular, otra propiedad de los fibroblastos fundamental en los procesos de reparación, se veía afectada por la haploinsuficiencia de endoglina. Para ello empleamos dos técnicas distintas: *wound healing* y ensayos de migración en *transwell*.

En primer lugar, analizamos, mediante *wound healing*, la capacidad de los MDF para reparar una herida realizada en una monocapa de células confluentes. Una vez realizada la herida, procurando que las heridas iniciales fueran iguales para evitar interferencias en el análisis, dejamos que las células migraran durante 24 horas y calculamos la distancia que habían migrado las células respecto a la distancia inicial. Observamos que las células deficientes en endoglina migran significativamente más que las células control (Figura 34A).

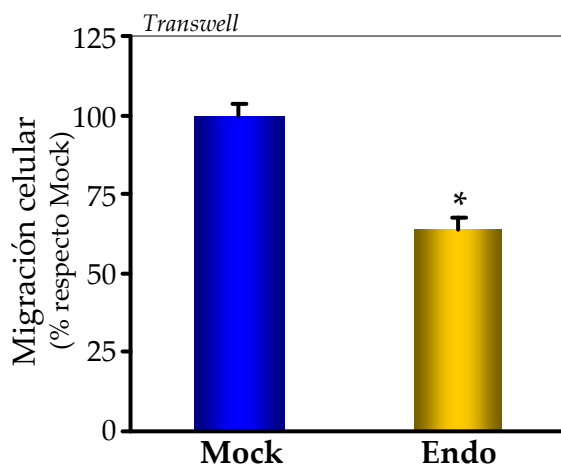
La segunda técnica empleada fueron los ensayos de migración a través de membranas con poros de 8  $\mu\text{m}$ , o ensayos de migración en *transwell*. Para ello, sembramos las células en el compartimento superior del *transwell*, en medio de cultivo con un 2% de suero, y dejamos que migraran durante 16 horas hacia el compartimento inferior que tenía medio de cultivo con un 10% de suero que actuó como quimioatrayente. Como habíamos visto con la técnica del *wound healing*, los fibroblastos  $Eng^{+/-}$  migraron significativamente más que los  $Eng^{+/+}$  (Figura 34B).

Podemos concluir por tanto que la haploinsuficiencia de endogлина favorece la migración de los MDF ya que los fibroblastos  $Eng^{+/-}$  migran más que los  $Eng^{+/+}$ .



**Figura 34. Migración celular de MDF  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ .** Estudiamos la migración de los MDF  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  con dos técnicas diferentes. **(A)** Mediante la técnica de reparación de la monocapa (o *wound healing*), calculamos la distancia migrada por las células después de 24 h. Se representa la media+EEM de 2 experimentos (n=96 puntos). **(B)** Por otro lado, analizamos la capacidad invasiva de los MDF a través de una membrana de 8  $\mu\text{m}$ . Se representa la media+EEM de 3 experimentos. \*  $p < 0,05$  vs  $Eng^{+/+}$ .

Analizamos también el efecto de la expresión de endogлина sobre la migración celular empleando los fibroblastos NIH3T3 que sobreexpresan L-endogлина humana. El análisis de la migración a través de *transwell* reveló que el incremento en la expresión de endogлина inhibe la migración de estos fibroblastos (figura 35).



**Figura 35. Migración celular de fibroblastos NIH3T3 infectados con endoglina.** Analizamos la capacidad invasiva de los fibroblastos infectados con endoglina humana (Endo) o con el vector vacío (Mock) a través de una membrana de 8  $\mu\text{m}$ . Se representa la media+EEM de 3 experimentos. \*  $p < 0,05$  vs  $Eng^{+/+}$ .

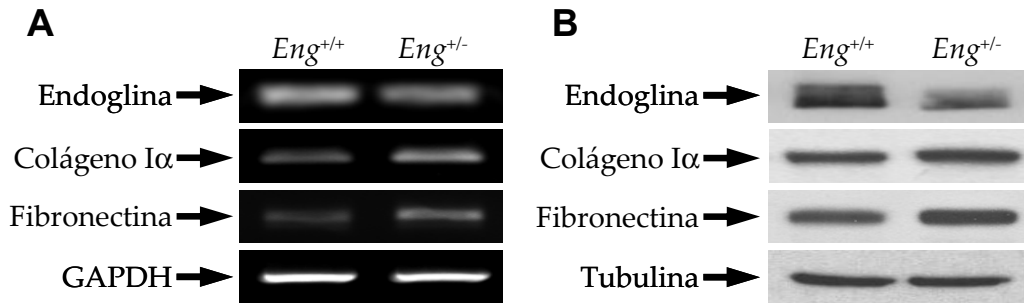
Con el conjunto de nuestros resultados, podemos concluir que la expresión de endoglina regula negativamente la migración de los fibroblastos.

### 3.3. Efecto de endoglina sobre la síntesis de matriz extracelular

La producción de componentes de la matriz extracelular por parte de los fibroblastos de la dermis es fundamental en los procesos de reparación. Además, existen trabajos que relacionan endoglina con la regulación de la síntesis de componentes de la matriz (Diez-Marques *et al.*, 2002; Guerrero-Esteo *et al.*, 1999; Letamendia *et al.*, 1998b; Obreo *et al.*, 2004). Por ello, estudiamos si la haploinsuficiencia de endoglina afectaba a la síntesis de dos componentes esenciales de la matriz extracelular como son colágeno tipo I $\alpha$  y fibronectina.

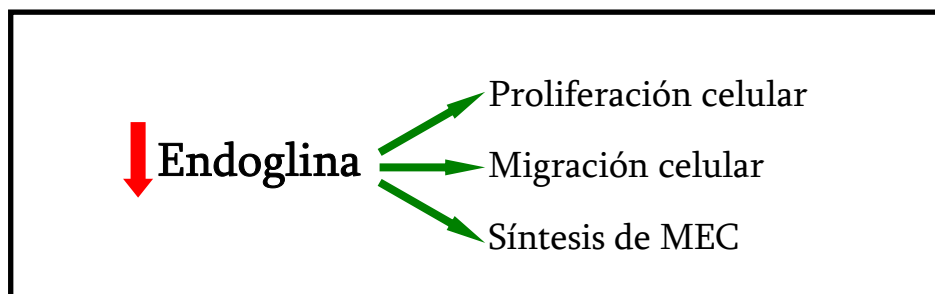
El análisis, mediante RT-PCR, de la expresión del mRNA reveló que los fibroblastos deficientes de endoglina tienen mayores niveles de expresión, tanto de fibronectina como de colágeno I $\alpha$ , que los fibroblastos control (Figura 36A). Cuando analizamos la expresión de proteína mediante *Western blot*, obtuvimos resultados semejantes si bien en el caso de la fibronectina las diferencias parecen más importantes que en la expresión de colágeno I $\alpha$  (Figura 36B). Parece por lo tanto que

la deficiencia de endoglina favorece la síntesis de componentes de la matriz extracelular.



**Figura 36. Síntesis de componentes de la matriz extracelular en MDF  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ .** Mediante RT-PCR (A) y *Western blot* (B), estudiamos la expresión de proteínas de la matriz extracelular en los MDF. Analizamos la expresión de colágeno I y fibronectina y utilizamos GAPDH y tubulina respectivamente como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 4 experimentos.

Con los resultados que hemos mostrado hasta ahora, podemos afirmar que la haploinsuficiencia de endoglina modifica ciertas propiedades de los fibroblastos de piel, que están implicadas en numerosos procesos fisiopatológicos, como son la proliferación y migración celular, así como la síntesis de componentes de la matriz extracelular. De esta forma, los fibroblastos con menor expresión de endoglina proliferan y migran más que aquellos con niveles de expresión de endoglina normales. En cuanto a la síntesis de moléculas de matriz extracelular hemos obtenido resultados similares (Figura 37).



**Figura 37. Efecto de la deficiencia de endoglina sobre los fibroblastos de piel**

Varios autores han relacionado previamente la expresión de endoglina con la modulación de diferentes propiedades celulares. Una de las propiedades celulares que más se ha relacionado con la expresión de endoglina ha sido la proliferación celular, ya que se ha observado un incremento de la expresión de endoglina en los endotelios angiogénicos de diferentes tipos de tumores (Bodey *et al.*, 1998a; Bodey *et al.*, 1998b; Bodey *et al.*, 1998c; Miller *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1994) y en HUVEC en estado proliferativo (Burrows *et al.*, 1995). Estudios llevados a cabo en células endoteliales han demostrado que la haploinsuficiencia de endoglina se asocia a una menor proliferación endotelial (Fernandez-L *et al.*, 2007; Jerkic *et al.*, 2006b; Lebrin *et al.*, 2004). Otros autores han obtenido resultados similares al estudiar el efecto de la expresión de endoglina sobre otros tipos celulares. De esta forma, se ha observado que el incremento en la expresión de L-endoglina induce la proliferación de mioblastos L6E9 (Velasco *et al.*, 2008) o que al inhibir la expresión de endoglina disminuye la proliferación de la línea queratinocítica PDV, característica del carcinoma escamoso (Perez-Gomez *et al.*, 2007). Se ha propuesto que este papel pro-proliferativo de endoglina se debe a que antagoniza el efecto antiproliferativo que ejerce TGF $\beta$ 1 sobre estos tipos celulares (Letamendia *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000b). La expresión de endoglina hace que TGF $\beta$ 1 señalice a través del receptor ALK1, en lugar de a través de ALK5, que da lugar a la activación de la proliferación celular (Lebrin *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2008). Sin embargo, nuestros resultados demuestran un efecto antiproliferativo de la expresión de endoglina en los fibroblastos de piel, por lo que el efecto de la expresión de endoglina sobre la proliferación celular parece ser dependiente del tipo celular. Como algunos autores han descrito que el efecto proliferativo de endoglina se debe a la modulación de la señalización de TGF $\beta$ , puede que la dependencia del efecto de endoglina sobre la proliferación se deba a la complejidad de los efectos biológicos de TGF $\beta$ . Está ampliamente aceptado que TGF $\beta$ 1 es un potente inhibidor de la proliferación celular, pero, como hemos mostrado en la introducción de este trabajo, esto no es así en todos los tipos celulares ya que en algunos induce proliferación celular. De esta forma, en aquellas células donde TGF $\beta$  promueve la proliferación celular cabría esperar que, si endoglina mantiene en esas células su papel como antagonista de



TGF $\beta$ , la expresión de endoglina inhiba la proliferación celular. En este sentido, se ha descrito que la incubación de células estromales derivadas de médula ósea con anticuerpos anti-endoglina produce el mismo efecto que el tratamiento con TGF $\beta$ : la activación de la proliferación celular (Rokhlin *et al.*, 1995). La hipótesis de que en nuestro modelo celular suceda algo similar es el punto de partida para los experimentos que llevamos a cabo más adelante en los que evaluamos el efecto de TGF $\beta$  sobre los MDF.

Otra de las propiedades celulares que hemos estudiado en este trabajo es la migración celular. Existen numerosos artículos en la literatura que demuestran que existe una relación entre la expresión de endoglina y la migración celular. De esta forma, se ha demostrado que las células endoteliales haploinsuficientes de endoglina presentan deficiencias en la migración celular (Fernandez-L *et al.*, 2007; Jerkic *et al.*, 2006b). Sin embargo, otros autores han descrito que células endoteliales derivadas de ratones *knockout* para endoglina migran más que las procedentes de los ratones *wildtype* (Lee *et al.*, 2008), por lo que no está claro el papel que ejerce endoglina en la migración de las células endoteliales. Lo que sí parece evidente es que el papel de endoglina es dependiente del tipo celular. Así, se ha descrito que es necesaria la expresión de endoglina para que el tratamiento con TGF $\beta$ 1 induzca la migración en células de músculo liso (Ma *et al.*, 2000). En el mismo sentido, recientemente se ha descrito que la sobreexpresión de endoglina en células metastáticas de cáncer de mama estimula la aparición de *invadopodia* y la migración de este tipo celular en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$ 1 (Oxmann *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha descrito que la expresión de endoglina inhibe la migración de células derivadas de carcinoma escamoso (Perez-Gomez *et al.*, 2007), células derivadas de cáncer de próstata (Craft *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2002) y de la línea de fibroblastos NCTC929 (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999). Nuestros resultados estarían, por lo tanto, en consonancia con los últimos que hemos descrito, ya que observamos cómo la mayor expresión de endoglina se relaciona con una menor migración y este resultado lo obtenemos tanto en los fibroblastos primarios de dermis como en los fibroblastos NIH3T3 que sobreexpresan endoglina.

Por último, nuestros resultados muestran que la disminución en la expresión de endoglina activa la expresión de genes de componentes de la matriz extracelular. Esta relación entre la expresión de endoglina y la síntesis de matriz extracelular ya ha sido descrita previamente por otros autores en diferentes tipos celulares y siempre en el mismo sentido que nuestros resultados. De esta forma, en las células endoteliales haploinsuficientes en endoglina hay un incremento en la síntesis de moléculas de matriz extracelular (Jerkic *et al.*, 2006b) y la sobreexpresión de L-endoglina inhibe la síntesis de matriz extracelular inducida por TGF $\beta$  en monocitos U- 937 (Lastres *et al.*, 1996), mioblastos L6E9 (Letamendia *et al.*, 1998b; Obreo *et al.*, 2004) y fibroblastos NCTC929 (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999).

Nuestros resultados demuestran, por primera vez, el efecto de endoglina sobre las propiedades celulares de fibroblastos de dermis, un tipo celular donde, hasta ahora, no se había descrito la expresión de esta proteína. La mayoría de los trabajos discuten cómo la expresión de endoglina modifica las diferentes respuestas celulares a TGF $\beta$  y se han propuesto diferentes modelos que intentan explicar el mecanismo molecular por el que esto sucede. Recientemente, nuestro grupo ha propuesto un modelo por el que la expresión de L- o S-endoglina determina la ruta de señalización activada en respuesta a TGF $\beta$ . Según el modelo, L-endoglina activa la vía de Smad1/5 que induce la activación de la proliferación celular. Por el contrario, S-endoglina activa la vía de Smad2/3 que provoca la síntesis de moléculas de matriz extracelular (Velasco *et al.*, 2008). Extrapolando el modelo a nuestros resultados, el efecto que endoglina ejerce sobre las propiedades celulares que hemos estudiado puede deberse a que la expresión de endoglina modula la respuesta celular a TGF $\beta$ 1. De esta forma, la expresión relativa de endoglina modificaría el patrón de activación de diferentes vías de señalización que se activan en respuesta a TGF $\beta$ 1.

Para comprobar si en nuestro modelo celular se está dando ese tipo de regulación, decidimos analizar la señalización de TGF $\beta$ 1 en los fibroblastos de piel.

## 4. Efecto de TGF $\beta$ 1 sobre los fibroblastos de piel

Endoglina se considera un receptor auxiliar de TGF $\beta$ . Además, existen numerosas referencias en la literatura que demuestran que la expresión de endoglina modula la señalización de TGF $\beta$  y, que de ese modo, regula diversos procesos celulares. Por esta razón decidimos estudiar la señalización de TGF $\beta$  en los fibroblastos y si la diferente expresión de endoglina modula dicha vía.

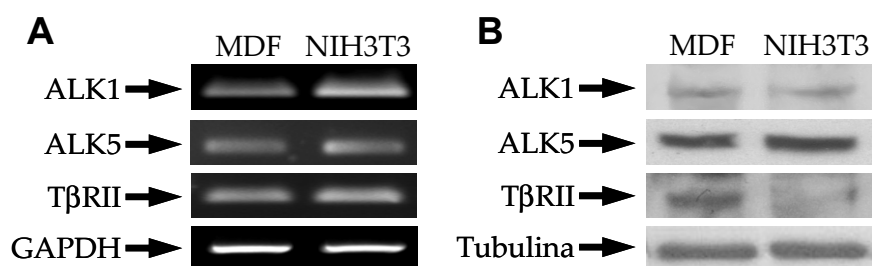
### 4.1. Estudio de la señalización de TGF $\beta$ 1 a través de Smads en fibroblastos

TGF $\beta$ 1 lleva a cabo sus acciones mediante la activación de dos familias de receptores de membrana serina/treonina quinasa específicos: los receptores tipo I y tipo II (Shi y Massague, 2003). TGF $\beta$ 1 se une al receptor tipo II (T $\beta$ RII), que se encuentra constitutivamente fosforilado, y este se une y activa al receptor tipo I, también conocido como receptor activina de tipo quinasa (ALK de “*activin receptor like kinase*”). Mientras que solo existe un receptor tipo II capaz de unirse a TGF $\beta$ 1 (T $\beta$ RII), se han descrito dos receptores tipo I para TGF $\beta$ 1: ALK5, ampliamente descrito en la mayoría de los tipos celulares, y ALK1, descrito inicialmente sólo en células endoteliales (Oh *et al.*, 2000). Como hemos explicado en la introducción de este trabajo, la unión de TGF $\beta$ 1 a ALK5 activa Smad2/3 mientras que su unión a ALK1 produce la activación de Smad1/5. En los últimos años, la vía de señalización de ALK1 se ha descrito en varios tipos celulares distintos a las células endoteliales (Daly *et al.*, 2008; Finnsen *et al.*, 2008; Scherner *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2008; Wiercinska *et al.*, 2006), sin embargo, no se ha estudiado la presencia de este receptor, ni la de su correspondiente vía de señalización, en fibroblastos de piel.

#### 4.1.1. Expresión de los receptores de TGF $\beta$ 1 en fibroblastos

Estudiamos la expresión de los receptores tipo I, ALK1 y ALK5, y tipo II, T $\beta$ RII, en la línea celular de fibroblastos NIH3T3 y en el cultivo primario de fibroblastos de dermis mediante RT-PCR y *Western blot*.

Como era de esperar, encontramos que ALK5 y T $\beta$ RII se expresan en los dos cultivos de fibroblastos. Además, observamos que el receptor tipo I ALK1 se expresa constitutivamente en los fibroblastos de piel y en los NIH3T3 (Figura 38).



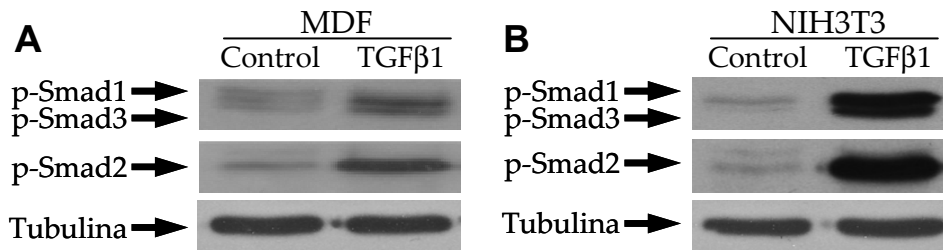
**Figura 38. Expresión de los receptores de la ruta de TGF $\beta$ .** Estudiamos la expresión de los receptores tipo I, ALK1 y ALK5, y tipo II, T $\beta$ RII, de TGF $\beta$  en fibroblastos MDF y NIH3T3 mediante RT-PCR (A) y *Western blot* (B).

#### 4.1.2. Activación de las R-Smads en respuesta a TGF $\beta$ 1

El receptor tipo I, una vez activado, transmite la señal hacia el núcleo fosforilando a miembros específicos de la familia Smad: las R-Smads. Los distintos receptores tipo I de la superfamilia de TGF $\beta$  transmiten su señal a través de distintas Smads; en el caso de ALK1, Smad1, Smad5 y Smad8 (Lebrin *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2000), y para ALK5, Smad2 y Smad3 (Massague y Gomis, 2006).

Por lo tanto, analizamos la fosforilación de las R-Smads, Smad1, Smad2 y Smad3 después del tratamiento con TGF $\beta$ 1. Para estudiar la activación de Smad3 hemos utilizado un anticuerpo que reconoce tanto Smad1 como Smad3. Estudios previos de nuestro laboratorio, realizados en otros tipos celulares, determinaron que la máxima activación en la fosforilación de las Smads se producía a los 30 minutos del tratamiento con TGF $\beta$ 1 y que el tratamiento con 1 ng/ml de TGF $\beta$ 1 era suficiente para observar la activación de las R-Smads (Velasco *et al.*, 2008). En estas condiciones, el tratamiento con TGF $\beta$ 1 induce, en los fibroblastos, la fosforilación de

Smad2 y de Smad3 pero también la de Smad1 (Figura 39). Por lo tanto, los receptores tipo I de TGF $\beta$ 1, ALK5 y ALK1 están presentes en fibroblastos y, además, en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$ 1, son capaces de activar a sus sustratos citoplasmáticos: Smad2, Smad3 y Smad1

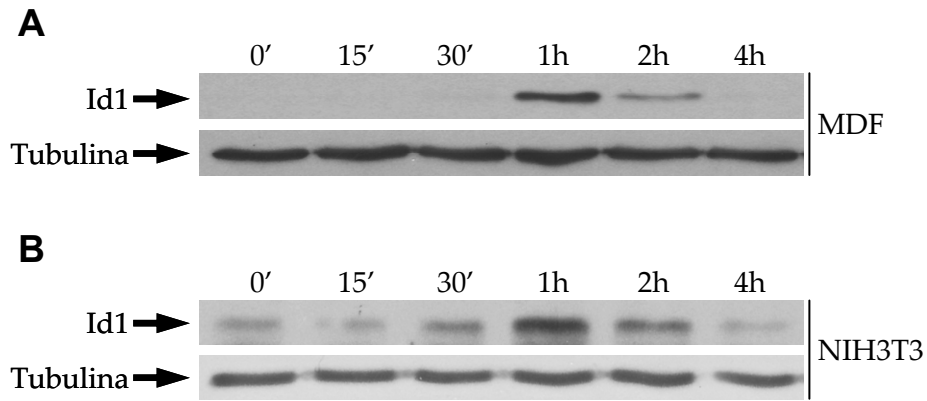


**Figura 39. Activación de Smad1/2/3 en respuesta a TGF $\beta$ 1.** En respuesta a un estímulo con TGF $\beta$ 1, 1 ng/ml durante 30 minutos, se activan Smad1/3 y Smad2 tanto en fibroblastos MDF (**A**) como NIH3T3 (**B**). La expresión de tubulina nos sirvió como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos distintos.

#### 4.1.3. Estudio de los elementos de respuesta a TGF $\beta$ 1 en fibroblastos

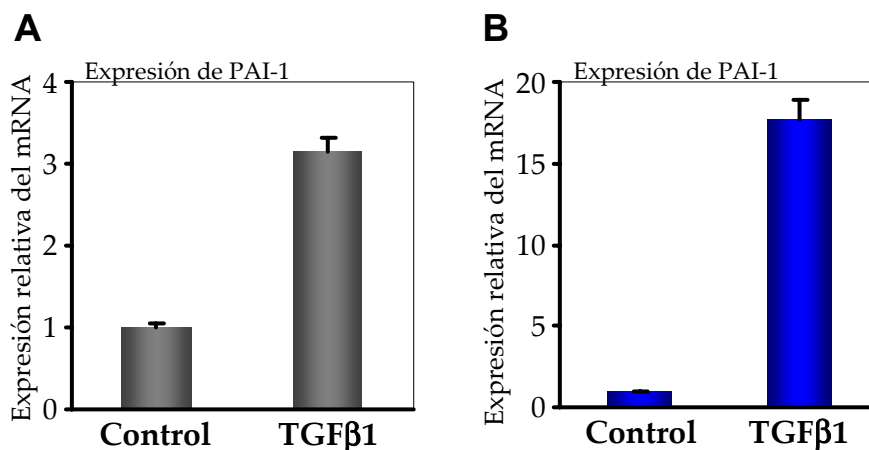
Para completar el estudio de las vías de señalización de TGF $\beta$ 1 analizamos elementos de respuesta característicos de las vías de ALK1-Smad1 y de ALK5-Smad2/3.

Id1 se identificó como un gen de respuesta a la activación de la vía de ALK1-Smad1 en células endoteliales (Goumans *et al.*, 2002; Lebrin *et al.*, 2004). Los miembros de la familia Id están implicados en proliferación celular y diferenciación (Hollnagel *et al.*, 1999). TGF $\beta$ 1 induce un incremento en la expresión de la proteína Id1 que es máximo una hora después de iniciar el tratamiento. Observamos este aumento de expresión tanto en las células de cultivo primario como en la línea celular NIH3T3 (Figura 40).



**Figura 40. Activación de Id1 en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$ 1.** Tiempo-respuesta para comprobar la activación de Id1 en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$ 1, 1 ng/ml, tanto en fibroblastos MDF (**A**) como NIH3T3 (**B**). La expresión de tubulina nos sirvió como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos distintos.

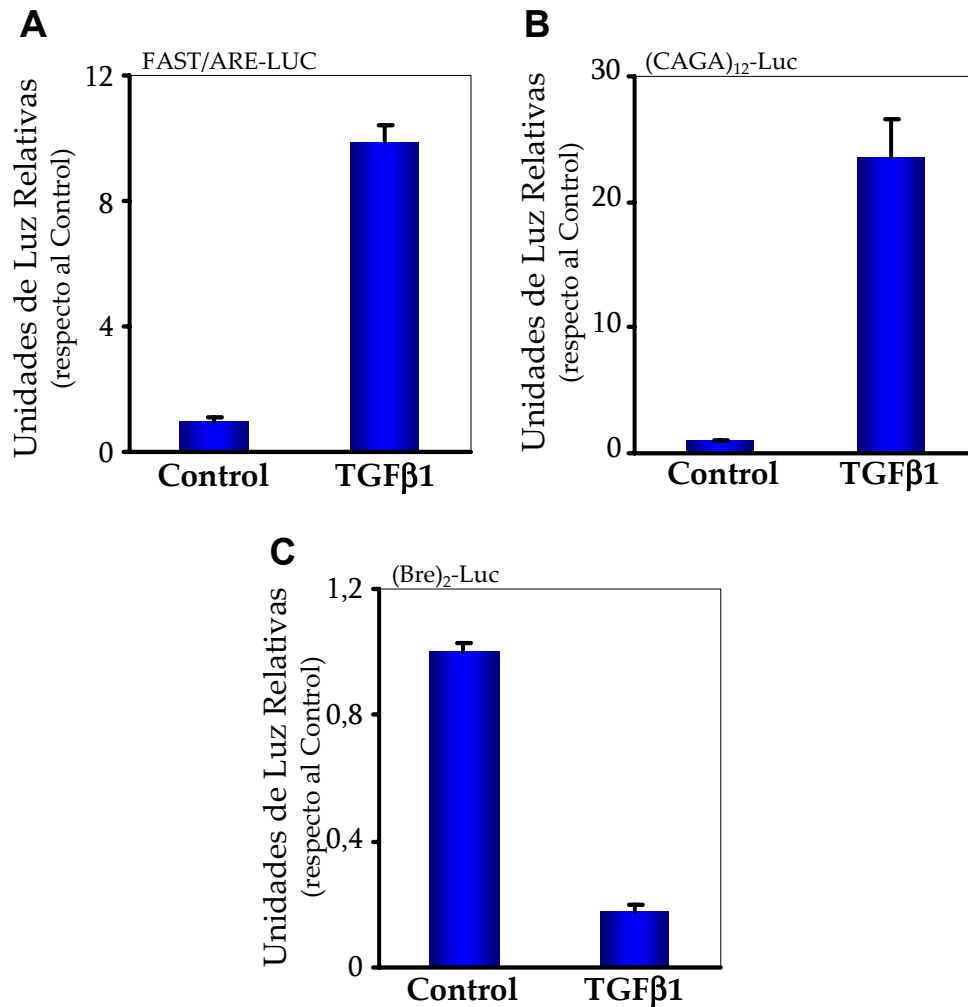
Estudiamos por PCR cuantitativa el efecto del tratamiento con TGF $\beta$ 1 durante 24 horas en el mRNA de PAI-1, gen de respuesta específico de Smad3 (Goumans *et al.*, 2002) y regulador de la matriz extracelular (Leask *et al.*, 2004). El tratamiento con TGF $\beta$ 1 induce un aumento de los niveles relativos del mRNA de PAI-1 en los dos tipos de fibroblastos, aunque este aumento es mayor en los NIH3T3 (Figura 41).



**Figura 41. Activación de la expresión de PAI-1 en respuesta a TGF $\beta$ 1.** Comprobamos, mediante PCR cuantitativa, el incremento en la expresión del mRNA de PAI-1 en respuesta a TGF $\beta$ 1 (1ng/ml) durante 24 horas en fibroblastos MDF (**A**) y NIH3T3 (**B**).

Por último llevamos a cabo en los fibroblastos NIH3T3 ensayos de actividad de promotor. Para ello, transfectamos los fibroblastos con tres plásmidos reporteros distintos: (Bre)<sub>2</sub>-Luc, FAST/ARE-Luc y (CAGA)<sub>12</sub>-Luc. El vector (Bre)<sub>2</sub>-Luc es un reportero específico de la vía de ALK1 que contiene elementos de respuesta del promotor de Id1 (Korchynskiy y ten Dijke, 2002). Los vectores FAST/ARE-Luc y el vector (CAGA)<sub>12</sub>-Luc son reporteros específicos de la vía de ALK5 que contienen elementos de respuesta específicos para Smad2 y Smad3 respectivamente (Dennler *et al.*, 1998; Labbe *et al.*, 1998; Watanabe y Whitman, 1999). Después de la transfección, tratamos las células durante 24 horas con TGFβ1 1ng/ml en medio con 10% de suero. Evaluamos la actividad de los promotores midiendo la actividad luciferasa utilizando el kit comercial descrito en la sección de *Material y métodos*. Para corregir la eficacia de la transfección, también evaluamos la actividad Renilla, para lo cual al realizar el ensayo cotransfectamos el plásmido pRL-TK.

El tratamiento de los fibroblastos con TGFβ1 durante 24 horas induce un aumento significativo en la actividad de los reporteros específicos de la vía de señalización de ALK5: FAST/ARE-Luc y (CAGA)<sub>12</sub>-Luc. Sin embargo cuando analizamos el efecto de TGFβ1 sobre el reportero (Bre)<sub>2</sub>-Luc observamos una importante activación basal que se inhibe tras el tratamiento con TGFβ1 (Figura 42).

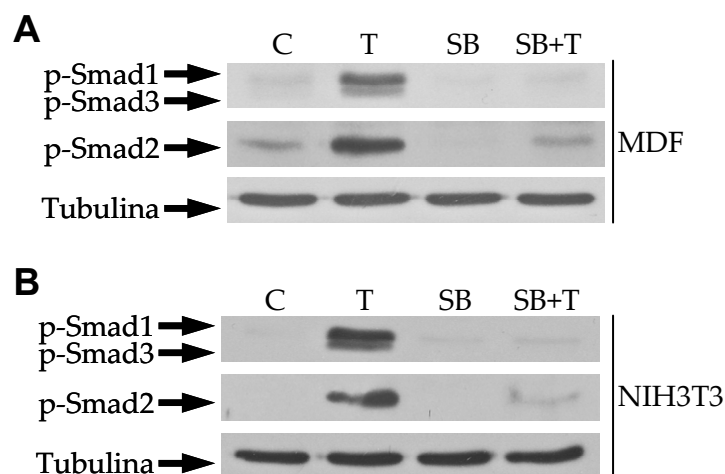


**Figura 42. Activación de promotores de elementos de respuesta a TGFβ en fibroblastos NIH3T3.** Comprobamos, en la línea de fibroblastos NIH3T3, el efecto de TGFβ1, 1 ng/ml, sobre la actividad de distintos promotores de respuesta a TGFβ. Se emplearon las construcciones FAST/ARE-Luc (A), un elemento de respuesta a Smad2, (CAGA)<sub>12</sub>-Luc (B), elemento de respuesta a Smad3, y (Bre)<sub>2</sub>-Luc (C), elemento de respuesta a Smad1/5. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.



#### 4.1.4. Interacción entre ALK1 y ALK5 en la señalización de TGFβ1

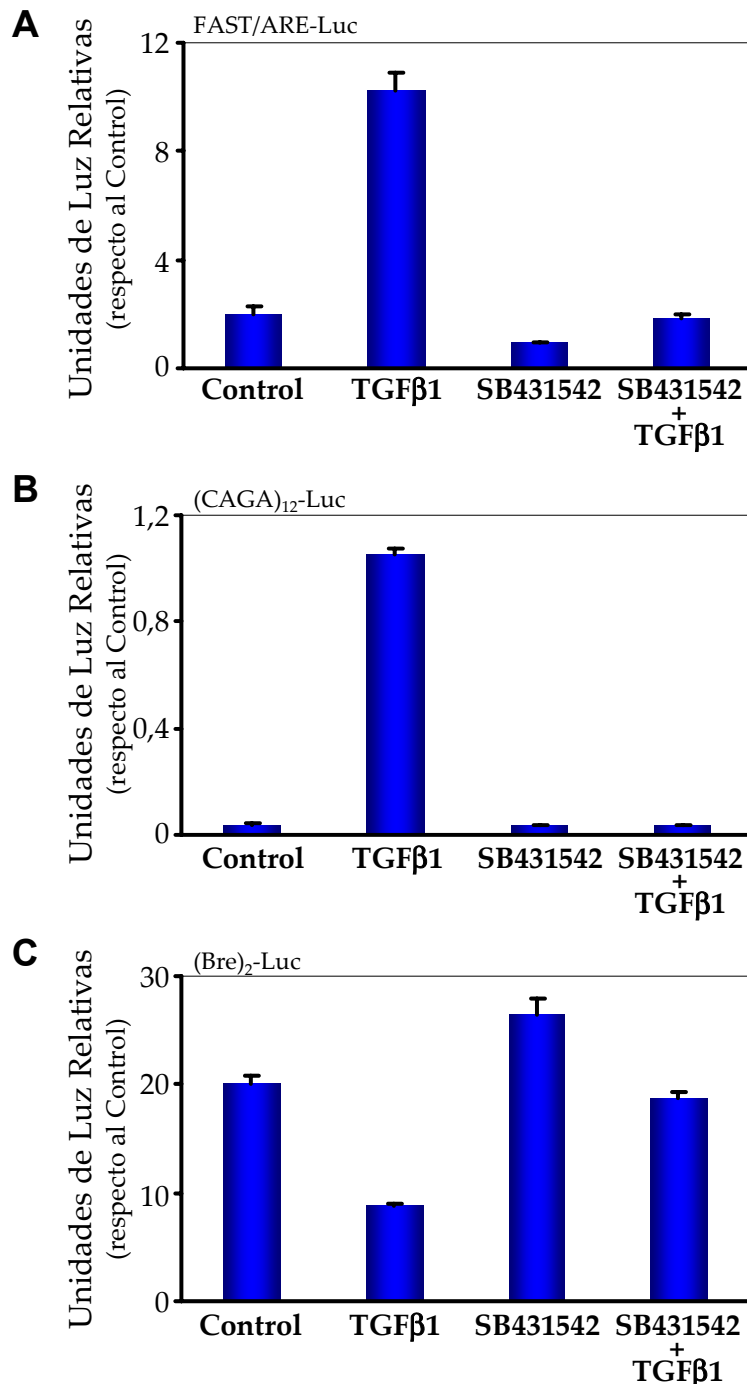
Algunos autores han observado en células endoteliales que el receptor tipo I, ALK5, es necesario para la señalización de TGFβ a través de ALK1 (Goumans *et al.*, 2003b). Quisimos estudiar si en los fibroblastos podría ocurrir un fenómeno similar, por lo que tratamos las células con el inhibidor de ALK5, SB431542 (5 μM), durante una hora y, a continuación, con TGFβ1 durante 30 minutos. El análisis por *Western blot* demostró que se produce una inhibición de la fosforilación no solo de Smad2 y Smad3, sino también de Smad1, en las células cotratadas con el inhibidor y TGFβ1 comparadas con las células tratadas solo con TGFβ1 (Figura 43). Como el SB431542 es un inhibidor específico de ALK5 (Inman *et al.*, 2002) y se ha demostrado que los receptores ALK1 son insensibles al mismo (Laping *et al.*, 2002), parece que el receptor de ALK1 necesita de la actividad del receptor ALK5 para que TGFβ1 pueda señalizar a través de él.



**Figura 43. Efecto del inhibidor SB431542 sobre la activación de Smads en respuesta a TGFβ1.** Estudiamos, en fibroblastos MDF (A) y NIH3T3 (B), el efecto del inhibidor de ALK5 SB431542 (SB) sobre la activación de Smads en respuesta al tratamiento con TGFβ1 (T), 1 ng/ml durante 30 minutos. Para ello, tratamos los fibroblastos con el inhibidor durante 1 hora, antes del tratamiento con TGFβ1.

También estudiamos la respuesta de los reporteros (Bre)<sub>2</sub>-Luc, FAST/ARE-Luc y (CAGA)<sub>12</sub>-Luc al tratamiento con TGFβ1 en presencia del inhibidor de ALK5, SB431542. Como hemos descrito previamente, cotransfectamos los genes reporteros con el plásmido pRL-TK. Después de la transfección, pretratamos las células con el

inhibidor SB431542 durante 1 hora antes de realizar el tratamiento con TGF $\beta$ 1 1ng/ml. Transcurridas 24 horas, evaluamos la actividad luciferasa en el luminómetro. El tratamiento con el SB431542 inhibe la acción de TGF $\beta$ 1 sobre los 3 reporteros estudiados (Figura 44).



**Figura 44.** Efecto del SB431542 sobre la activación de promotores de elementos de respuesta a TGF $\beta$  en fibroblastos NIH3T3. Analizamos el efecto del inhibidor de ALK5, SB431542, sobre la actividad de distintos promotores de respuesta a TGF $\beta$ , en la línea de fibroblastos NIH3T3. Se emplearon las construcciones FAST/ARE-Luc (A), un elemento de respuesta a Smad2, (CAGA)<sub>12</sub>-Luc (B), elemento de respuesta a Smad3, y (Bre)<sub>2</sub>-Luc, elemento de respuesta a Smad1/5. Se muestra un experimento representativo de un total de 3 experimentos realizados.

Nuestros resultados demuestran que en los fibroblastos de piel los dos receptores tipo I de TGF $\beta$ : ALK1 y ALK5, se expresan de manera constitutiva. Además, ambas vías son funcionales ya que en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$ 1 se produce fosforilación de Smad1, Smad2 y Smad3. Aunque la señalización de TGF $\beta$ 1 a través de ALK1 se describió originalmente en células endoteliales (Goumans *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2000), y a pesar de que algunos autores afirman que ALK1 se expresa exclusivamente en el endotelio (Seki *et al.*, 2003), diferentes autores han ido poco a poco describiendo la presencia y actividad de este receptor en neuronas (Konig *et al.*, 2005), células hepáticas estrelladas (Wiercinska *et al.*, 2006), condrocitos (Finnsen *et al.*, 2008) y la línea de mioblastos L6E9 (Schermer *et al.*, 2007). Recientemente, se ha descrito que la activación de Smad1/5 en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$ 1 es un proceso mucho más extendido de lo que se pensaba y que tiene lugar en muchas líneas epiteliales y mesénquimales (Daly *et al.*, 2008). Estos autores afirman que los receptores responsables de esa activación son ALK2 y ALK3, en lugar de ALK1, ya que, supuestamente, este no se expresa más que en el endotelio. Nuestros resultados demuestran que en fibroblastos se expresa tanto el mRNA como la proteína de ALK1. Sin embargo, al no haber analizado la expresión de ALK2 y ALK3 y, sobre todo, al no haber demostrado la interacción directa en nuestras células entre ALK1 y Smad1/5, no podemos afirmar con toda seguridad que la activación de Smad1/5 en respuesta al TGF $\beta$  se produzca a través de ALK1 y no de ALK2 o ALK3.

Para comprobar que tanto la vía de Smad1/5 como la de Smad2/3 son funcionales, estudiamos la activación de genes de respuesta específicos para cada una de las vías. En primer lugar, analizamos la actividad de los reporteros ARE-Luc y (CAGA)<sub>12</sub>-Luc, dos reporteros específicos de la ruta de ALK5. Nuestros resultados demuestran que la actividad de ambos reporteros aumenta tras el tratamiento con TGF $\beta$ 1, lo que coincide con los resultados mostrados anteriormente por otros autores (Goumans *et al.*, 2003a; Goumans *et al.*, 2002; Schermer *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2008). Sin embargo, al analizar la activación del promotor (Bre)<sub>2</sub>-Luc, que nos permite monitorizar la ruta de ALK1, observamos cómo tras el tratamiento con TGF $\beta$ 1 no solo se detecta una activación del promotor, sino que se aprecia una

inhibición. Otros autores ya habían observado esta ausencia de activación de (Bre)<sub>2</sub>-Luc previamente (Craft *et al.*, 2007; David *et al.*, 2007a; David *et al.*, 2007b; Scherner *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2008), pero hasta hace poco no se había propuesto el mecanismo por el que esto sucede. Tras el tratamiento con TGFβ<sub>1</sub>, y la activación tanto de Smad2/3 como de Smad1/5, se forman complejos Smad1/5-Smad4 y Smad2/3-Smad4, pero también se forman complejos Smad1/5-Smad2/3 sin la participación de Smad4. Así, Smad2/3 compite con Smad4 para formar, sin la presencia de la Co-Smad, estos complejos, que no serían detectados por (Bre)<sub>2</sub>-Luc ya que este contiene secuencias específicas de unión de los complejos Smad1/5-Smad4 (Daly *et al.*, 2008).

Id1 y PAI-1 son proteínas que se han descrito, específicamente, como dianas de la ruta de ALK1 y ALK5, respectivamente. Nuestros resultados demuestran cómo, en consonancia con los resultados obtenidos en otros tipos celulares (Finsson *et al.*, 2008; Goumans *et al.*, 2002; Scherner *et al.*, 2007; Wiercinska *et al.*, 2006), el tratamiento con TGFβ<sub>1</sub> induce un incremento en la expresión de ambas proteínas en los fibroblastos.

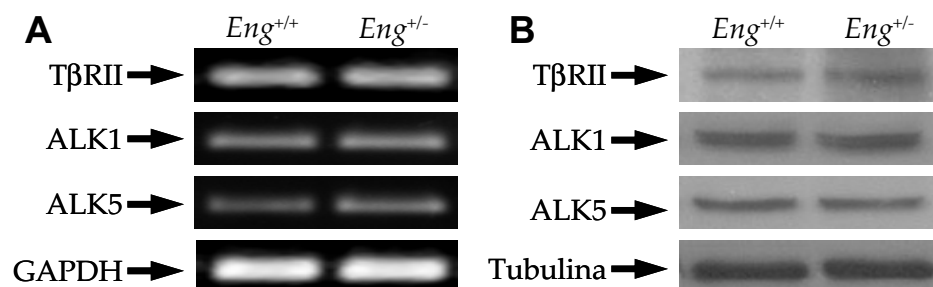
Por último, observamos que al tratar los fibroblastos con el inhibidor específico de la actividad quinasa de ALK5, SB431542, se produce una inhibición de ambas vías, lo que indica que es necesaria la presencia funcional de ALK5 para que se transmita la señal a través de ALK1. Recientemente, se ha descrito que la presencia del *loop* L45 de ALK5 es necesaria para la activación de Smad1/5 (Liu *et al.*, 2009). Por lo tanto, parece que, para que se produzca la fosforilación de Smad1/5, es necesaria la formación de complejos de receptores que implicarían la presencia tanto de ALK5 como de ALK1, ALK2 o ALK3.

## 4.2. Efecto de endoglina sobre la ruta de TGF $\beta$ 1 en fibroblastos de piel

Numerosos estudios han descrito el efecto modulador que ejerce endoglina sobre la señalización de TGF $\beta$ 1, principalmente en la regulación de la señalización a través de ALK1 o de ALK5. Además, esta regulación se ha relacionado con el papel que ejerce endoglina sobre las propiedades biológicas de diferentes tipos celulares (Blanco *et al.*, 2005; Craft *et al.*, 2007; Lebrin *et al.*, 2004; Pece-Barbara *et al.*, 2005). Por lo tanto, decidimos estudiar si la diferente expresión de endoglina modulaba la señalización de TGF $\beta$ 1 en los fibroblastos. Para ello, analizamos si había diferencias en alguno de los puntos de las vías de señalización entre los fibroblastos *Eng*<sup>+/+</sup> o *Eng*<sup>+/-</sup>.

### 4.2.1. Expresión de los receptores de TGF $\beta$ 1

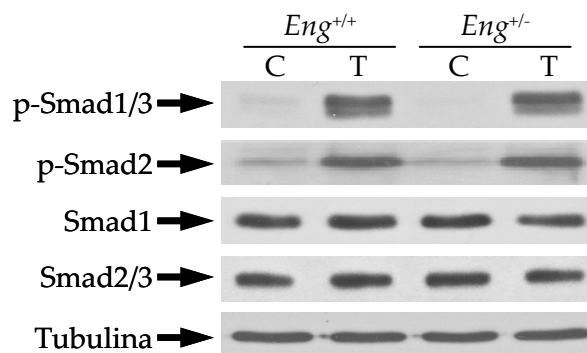
En primer lugar, estudiamos si la diferente expresión de endoglina podía modificar la expresión de los receptores de TGF $\beta$ 1 en los fibroblastos. Al analizar mediante RT-PCR los niveles de mRNA de ALK1, ALK5 y T $\beta$ RII en los fibroblastos haploinsuficientes de endoglina y sus controles, no encontramos diferencias de expresión entre ellos (Figura 45A). El análisis de la expresión de los receptores mediante *Western blot* muestra resultados similares a los obtenidos al analizar el mRNA (Figura 45B). Podemos concluir que la haploinsuficiencia de endoglina no modifica la expresión de los receptores.



**Figura 45. Expresión de receptores de la ruta de TGF $\beta$  en MDF haploinsuficientes de endoglina.** Analizamos la expresión del receptor tipo II, T $\beta$ RII, así como de los receptores tipo I, ALK1 y ALK5, de TGF $\beta$  en MDF mediante RT-PCR (A) o *Western blot* (B). Como control de carga, analizamos la expresión GAPDH y tubulina, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos.

#### 4.2.2. Activación de las R-Smads en respuesta a TGFβ1

Algunos autores han descrito que la expresión de endogлина modula la activación de las Smads, modificando de esta forma la señalización de TGFβ1 (Lebrin *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2008). Por esa razón, estudiamos si la activación de las R-Smads: Smad1, Smad2 y Smad3, se veía modificada por la diferente expresión de endogлина. Tratamos los MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> con 1 ng/ml de TGFβ1 durante 30 minutos y analizamos, mediante *Western blot*, la fosforilación de las R-Smads. Como hemos descrito previamente (Figura 38), Smad1, Smad2 y Smad3 se fosforilan en respuesta al tratamiento con TGFβ1, sin embargo, no observamos diferencias en la fosforilación de las Smads entre los MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> (Figura 46). El tratamiento con TGFβ1 durante 30 minutos tampoco modifica la expresión de las R-Smads. Parece por lo tanto que la expresión de endogлина no afecta a la activación de las Smads en los MDF.



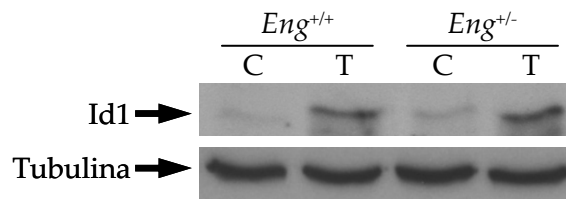
**Figura 46. Activación de las Smads 1, 2 y 3 en respuesta a TGFβ1 en MDF haploinsuficientes de endogлина.** Comprobamos cómo, en respuesta a un estímulo de TGFβ1 de 1 ng/ml durante 30 minutos, se activan Smad1/3 y Smad2 tanto en MDF *Eng*<sup>+/+</sup> como *Eng*<sup>+/-</sup>. La expresión de las R-Smads no se ve modificada tras el tratamiento con TGFβ1. La expresión de tubulina nos sirvió como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos distintos.

#### 4.2.3 Estudio de los elementos de respuesta a TGFβ1 en fibroblastos

Para continuar con el estudio del efecto de endogлина sobre la señalización de TGFβ1 en MDF, analizamos la expresión de Id1 y de PAI-1. La expresión de Id1 y PAI-1 se ve estimulada, en respuesta a la señalización de TGFβ1, a través de ALK1 y ALK5, respectivamente. Como no encontramos diferencias en la fosforilación de las

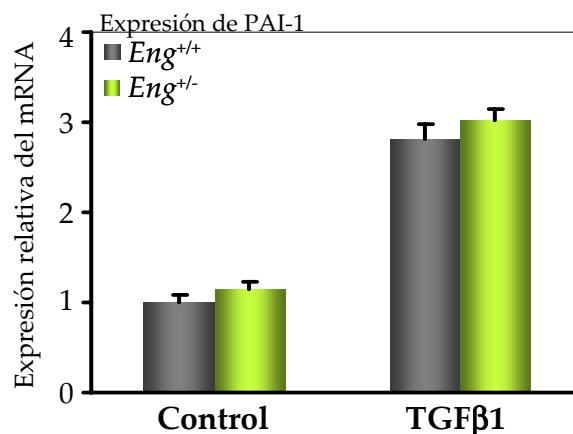
Smads, quisimos estudiar si endogлина podía ejercer algún tipo de regulación en otro punto de las vías de señalización de TGF $\beta$ 1.

Analizamos mediante *Western blot* la expresión de Id1 en los MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>. Para ello, tratamos las células con 1 ng/ml de TGF $\beta$ 1 durante 1 hora, condiciones en las que ya habíamos visto el efecto de TGF $\beta$ 1 sobre la expresión de Id1 (Figura 40). El tratamiento con TGF $\beta$ 1 induce la expresión de Id1, pero no observamos diferencias en la expresión de esta proteína entre los fibroblastos *Eng*<sup>+/+</sup> y los *Eng*<sup>+/-</sup> (Figura 47).



**Figura 47. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la expresión de Id1.** Observamos el incremento de la expresión de Id1, en respuesta a un tratamiento con TGF $\beta$ 1, 1 ng/ml durante 1 hora, en MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>. La expresión de tubulina nos sirvió como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos distintos.

A partir del mRNA de los MDF estudiamos, mediante PCR cuantitativa, si la diferente expresión de endogлина modifica la expresión de PAI-1 en respuesta a TGF $\beta$ 1. El tratamiento con TGF $\beta$ 1 produce un incremento en la expresión del mRNA de PAI-1 en los MDF, pero no encontramos diferencias entre los MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> (Figura 48).



**Figura 48. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la expresión de PAI-1.** Comprobamos, mediante PCR cuantitativa, el incremento en la expresión del mRNA de PAI-1 en respuesta al tratamiento con TGF $\beta$ 1 (1ng/ml) durante 24 horas en fibroblastos MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>.

Hemos analizado el efecto de la expresión de endoglina sobre la señalización de TGF $\beta$ 1 en MDF. Diferentes autores han reseñado la regulación que ejerce endoglina sobre la señalización de TGF $\beta$ 1 en diferentes modelos celulares. Así, estudios llevados a cabo en células endoteliales demuestran que la expresión de endoglina inhibe la señalización de TGF $\beta$  a través de Smad2/3 y potencia la señalización a través de Smad1/5 (Blanco *et al.*, 2005; Lebrin *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Warrington *et al.*, 2005). Sin embargo, en el mismo tipo celular otros autores han obtenido los resultados contrarios, es decir, que endoglina inhibe la activación de Smad1/5 en respuesta a TGF $\beta$ 1 (Pece-Barbara *et al.*, 2005). Esto también se ha estudiado en otros tipos celulares como en células de cáncer de próstata PC3-M, en las que endoglina activa Smad1 (Craft *et al.*, 2007); en linfocitos T (Schmidt-Weber *et al.*, 2005) y en células de carcinoma fusocelular CarC (Perez-Gomez *et al.*, 2007), donde la expresión de endoglina inhibe la activación de Smad2/3; y en mioblastos, en los que se ha demostrado que la expresión de L-endoglina inhibe la señalización de TGF $\beta$  a través de ALK5 y la promueve a través de ALK1 (Letamendia *et al.*, 1998b; Scherner *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2008).

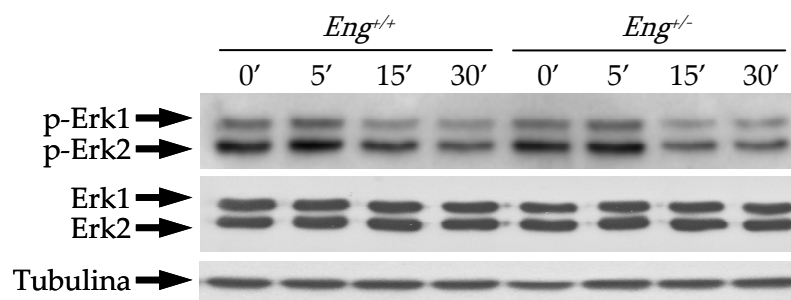
Nosotros hemos estudiado la expresión de los receptores, la fosforilación de las R-Smads y la expresión de elementos de respuesta a las vías de señalización de TGF $\beta$  y no encontramos diferencias entre los MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> ni en la expresión de los receptores ni en la fosforilación de las R-Smads ni en la expresión de Id1 o PAI-1. Parece por lo tanto que, en nuestro modelo, la señalización de TGF $\beta$  a través de la vía clásica de las Smads es independiente de la expresión de endoglina.



### 4.3. Efecto de endogлина sobre otras rutas de señalización de TGFβ1

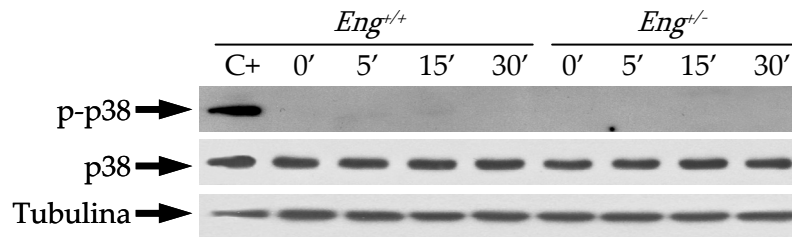
Nuestros resultados demuestran que endogлина no regula la señalización de TGFβ1 a través de las Smads. Sin embargo, TGFβ es capaz de activar vías diferentes a la de las Smads que también pueden ejercer un papel importante regulando distintas propiedades de los fibroblastos. Por esta razón, analizamos el posible efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la activación de las vías de MAPKs más importantes (Erk1/2, p38 y JNK) y sobre la vía de PI3K/Akt. Para ello, tratamos nuestras células con TGFβ1 durante 5, 15 y 30 minutos y estudiamos, mediante *Western blot*, la fosforilación de las proteínas efectoras de las diferentes vías.

Los MDF presentan una fosforilación basal de Erk1 y de Erk2, cuando son cultivados en presencia de 10% de suero, sin que se observen diferencias entre los *Eng*<sup>+/+</sup> y los *Eng*<sup>+/-</sup>. A los 5 minutos de tratamiento con TGFβ1, observamos un incremento en la fosforilación tanto de Erk1 como de Erk2 que, sin embargo, disminuye, por debajo del nivel basal, tras 15 y 30 minutos de tratamiento (Figura 49). El tratamiento con TGFβ1 no modifica los niveles totales de Erk1 y de Erk2. Además, no encontramos diferencias ni en la activación ni en la expresión de Erk1/2 causadas por la diferente expresión de endogлина en los fibroblastos.



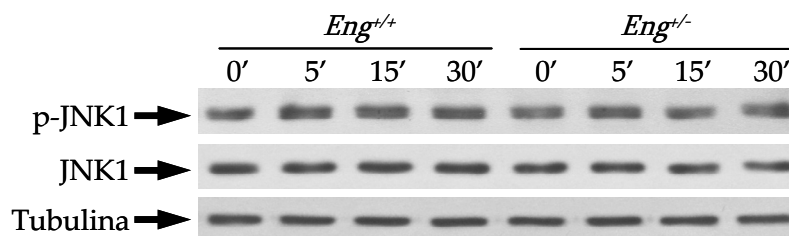
**Figura 49. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la activación de Erk1/2.** Analizamos la fosforilación y la expresión de Erk1 y Erk2 en MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>, en respuesta a un tratamiento con TGFβ1, a una concentración de 1 ng/ml, durante los tiempos indicados. La expresión de tubulina nos sirvió como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos distintos.

Estudiamos también la activación de la vía de p38. En nuestras células no somos capaces de detectar la fosforilación de p38 a ninguno de los tiempos indicados (Figura 50). Utilizamos como control positivo el tratamiento con sorbitol a una concentración 0,7 M durante 30 minutos que sí produjo la activación de p38 en los fibroblastos. No observamos ningún cambio en la expresión de p38 después del tratamiento con TGF $\beta$ 1.



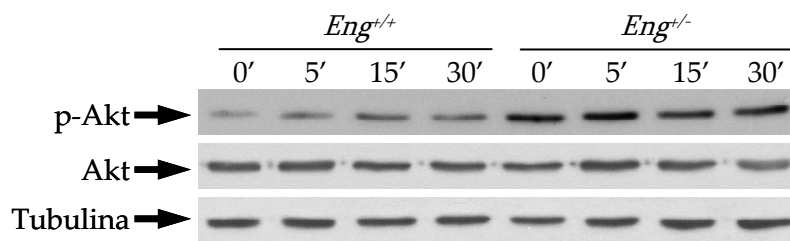
**Figura 50. Efecto de la haploinsuficiencia de endoglina sobre la activación de p38.** Analizamos la fosforilación y la expresión de p38 en MDF  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ , en respuesta a un tratamiento con TGF $\beta$ 1, a una concentración de 1 ng/ml, durante los tiempos indicados. La expresión de tubulina nos sirvió como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos distintos.

Por último, analizamos la activación de JNK1. En los MDF, existe una importante activación basal de JNK1. El tratamiento con TGF $\beta$ 1 induce un rápido incremento, desde los 5 minutos, en la fosforilación de JNK1 que se mantiene más allá de los primeros 30 minutos, pero que es similar entre los  $Eng^{+/+}$  y los  $Eng^{+/-}$  (Figura 51). No encontramos diferencias en la expresión de JNK1 tras el tratamiento con TGF $\beta$ 1.



**Figura 51. Efecto de la haploinsuficiencia de endoglina sobre la activación de JNK1.** Analizamos la fosforilación y la expresión de JNK1 en MDF  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ , en respuesta a un tratamiento con TGF $\beta$ 1, a una concentración de 1 ng/ml, durante los tiempos indicados. La expresión de tubulina nos sirvió como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos distintos.

Además de analizar las diferentes vías de MAPKs, estudiamos la activación de la vía de PI3K/Akt en respuesta a TGF $\beta$ 1. Detectamos una activación basal de Akt en los MDF que es mayor en los fibroblastos haploinsuficientes que en los controles (Figura 52). El tratamiento con TGF $\beta$ 1 parece inducir una activación de Akt, pero esta sigue siendo más alta en los MDF *Eng*<sup>+/-</sup> que en los *Eng*<sup>+/+</sup>. No observamos diferencias en la expresión de Akt ni entre los dos tipos de células ni tras el tratamiento con TGF $\beta$ 1.



**Figura 52. Efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la activación de Akt.** Analizamos la fosforilación y la expresión de Akt en MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>, en respuesta a un tratamiento con TGF $\beta$ 1, a una concentración de 1 ng/ml, durante los tiempos indicados. La expresión de tubulina nos sirvió como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos distintos.

Como hemos explicado en la introducción del trabajo, además de la vía clásica de las Smads, TGF $\beta$  puede activar otras rutas de señalización, como las vías de MAPKs o la vía de PI3K/Akt. No se ha estudiado en profundidad el mecanismo por el cual se produce esta activación, pero parece que es un proceso dependiente de la actividad quinasa del receptor tipo I (Zhang, 2009). Aunque se ha descrito que endogлина es capaz de variar la respuesta a TGF $\beta$ 1 modulando la actividad de los receptores y, de esa forma, la fosforilación de las Smads (Blanco *et al.*, 2005), apenas hay estudios que relacionen la expresión de endogлина con la modulación de la activación de otras vías en respuesta a TGF $\beta$ . Estos estudios, que se han llevado a cabo en mioblastos L<sub>6</sub>E<sub>9</sub>, describen cómo la expresión de L-endogлина modifica la activación de Erk1/2 y JNK (Guo *et al.*, 2004; Rodríguez-Barbero *et al.*, 2006). Nuestros resultados no muestran ningún efecto de la haploinsuficiencia de endogлина sobre la activación de las vías de MAPKs. Sin embargo, parece claro que la haploinsuficiencia de endogлина provoca una diferente activación de Akt.

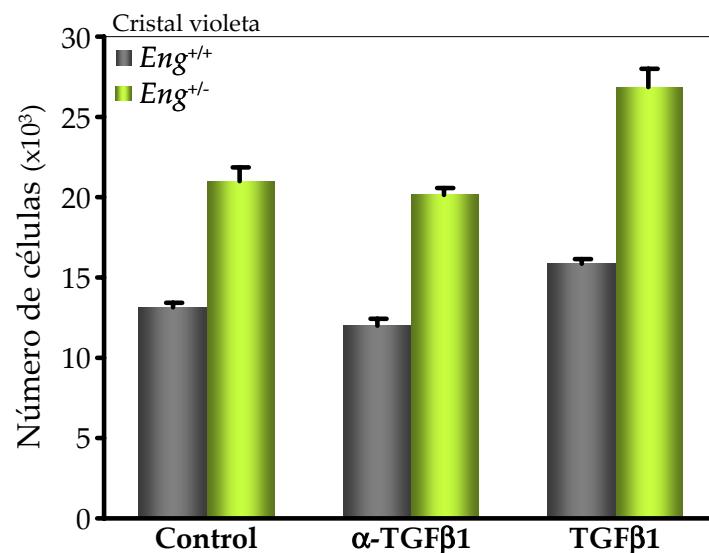
#### 4.4. Efecto del tratamiento con TGFβ1 sobre las propiedades biológicas de los fibroblastos de piel

Estudiamos el efecto directo del tratamiento con TGFβ1 sobre la proliferación y migración de los fibroblastos de piel haploinsuficientes en endogлина. De esta forma, podremos determinar si el efecto de la expresión de endogлина sobre los fibroblastos se debe a una regulación de la señalización de TGFβ o si su efecto es independiente de esta citoquina.

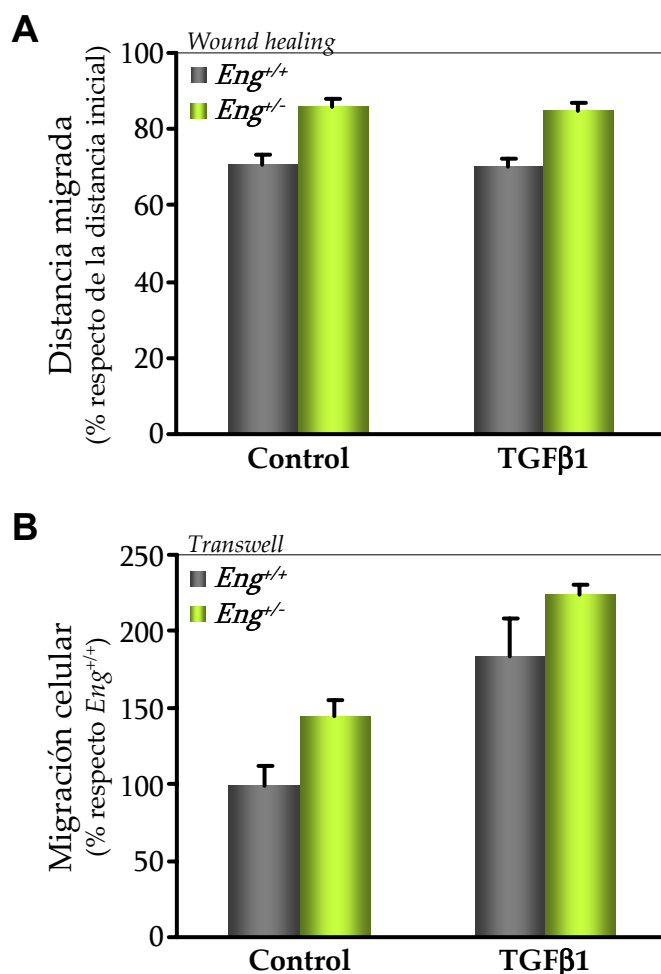
Para analizar el efecto de TGFβ1 sobre la proliferación celular, sembramos el mismo número de fibroblastos *Eng<sup>+/+</sup>* y *Eng<sup>+/-</sup>* y estudiamos su proliferación a lo largo de 4 días bajo distintos tratamientos. Analizamos el efecto del tratamiento con TGFβ1 sobre la proliferación de los fibroblastos de piel y si la respuesta celular es dependiente o no de la expresión de endogлина. Además, tratamos las células con un anticuerpo neutralizante de TGFβ1. De esta forma, eliminamos la acción del TGFβ1 presente en el medio así como del que las células pudieran estar sintetizando. TGFβ1 favorece la proliferación de los fibroblastos de piel y el anticuerpo neutralizante de TGFβ1 la inhibe levemente. Sin embargo, el efecto de los tratamientos sobre los MDF *Eng<sup>+/+</sup>* y *Eng<sup>+/-</sup>* es el mismo (Figura 53). Estos resultados demuestran, por tanto, que la mayor proliferación de los MDF *Eng<sup>+/-</sup>*, con respecto a los *Eng<sup>+/+</sup>*, no se debe a un papel modulador de endogлина sobre la acción de TGFβ1 en la célula.

Por otro lado, analizamos el efecto de TGFβ1 sobre la migración de los fibroblastos empleando para ello las técnicas del *Wound healing* y de migración a través de *transwell*. En el primer caso, tratamos las células con 1 ng/ml de TGFβ1 añadido en una sola dosis justo después de realizar las heridas y analizamos la distancia migrada después de 24 horas. En estas condiciones, no observamos que TGFβ1 ejerza ningún efecto sobre la migración celular en ninguno de los dos genotipos, por lo que seguimos observando que los fibroblastos haploinsuficientes migran más que los controles, como ya hemos descrito anteriormente (Figura 54A). Pero también quisimos estudiar el efecto de TGFβ1 sobre la migración a través de *transwell*. Para ello, sembramos las células en el compartimento superior del *transwell*, en medio de cultivo al 2% de suero y en presencia o no de 1 ng/ml de

TGF $\beta$ 1, y analizamos la cantidad de células que migraron hacia el compartimento inferior, que contenía medio con 10% de suero, después de 16 horas. De esta forma, seguimos empleando el gradiente de suero como quimioatrayente y podemos analizar el efecto de TGF $\beta$ 1 como inductor de la migración. Observamos cómo, tanto en *Eng*<sup>+/+</sup> como en *Eng*<sup>+/-</sup>, ha migrado un mayor número de células cuando tratamos con TGF $\beta$ 1. Sin embargo, el incremento es el mismo en ambos casos por lo que las diferencias en migración se mantienen (Figura 54B). De esta forma, podemos decir que TGF $\beta$ 1 promueve la migración de los fibroblastos *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>, pero que endogлина no modula la respuesta celular a TGF $\beta$ 1.



**Figura 53. Efecto de TGF $\beta$ 1 sobre la proliferación de los MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>.** Estudiamos la proliferación celular estimando, mediante la técnica del cristal violeta, el número de células tras 4 días. Para analizar el efecto del TGF $\beta$ 1 sobre la proliferación de los MDF deficientes en endogлина y sus respectivos controles, tratamos las células, desde el día siguiente a la siembra, con un anticuerpo bloqueante de TGF $\beta$ 1 ( $\alpha$ -TGF $\beta$ 1) o con TGF $\beta$ 1 (1ng/ml). La gráfica corresponde a un experimento representativo de 3 experimentos totales. Se representa la media+EEM (n=4 pocillos).



**Figura 54. Efecto de TGFβ1 sobre la migración de los MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>.** (A) Estudiamos el efecto del tratamiento con TGFβ1 sobre la migración celular mediante la técnica *wound healing*. Para ello, calculamos la distancia migrada por las células después de 24 horas en presencia del TGFβ1 (1 ng/ml). Se representa la media+EEM de 2 experimentos (n=96 puntos). (B) Por otro lado, analizamos el efecto del tratamiento con TGFβ1 (1 ng/ml) sobre la capacidad invasiva de los MDF a través de una membrana de 8 μm. La gráfica corresponde a un experimento representativo. Se representa la media+EEM (n=4 pocillos).

Se ha propuesto que endoglin regula la proliferación celular antagonizando el efecto antiproliferativo de TGFβ1 (Letamendia *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000b). En términos generales, endoglin inhibe la señalización de TGFβ1 a través de Smad2/3, y de esta forma el efecto citostático de TGFβ, y la promueve a través de Smad1/5 (Lebrin *et al.*, 2005). Sin embargo, al analizar nuestros resultados no observamos que endoglin module el efecto de TGFβ1 sobre la proliferación celular. Observamos

cómo, igual que en resultados previos de otros autores (Giannouli y Kleetsas, 2006; Strutz *et al.*, 2001), TGF $\beta$ 1 activa la proliferación. Sin embargo, las diferencias observadas entre los MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> se mantienen, es decir, el efecto de TGF $\beta$ 1 sobre las células es el mismo independientemente de la expresión de endoglina. En este sentido, nuestro grupo ya ha propuesto que endoglina ejerce un efecto sobre la proliferación celular independiente de TGF $\beta$ 1 (Velasco *et al.*, 2008).

El efecto de TGF $\beta$ 1 sobre la migración de los fibroblastos de piel fue descrito hace tiempo (Postlethwaite *et al.*, 1987) y es una de sus funciones mejor caracterizadas en la cicatrización de heridas. Sin embargo, al analizar el efecto de TGF $\beta$ 1 sobre la migración de los MDF encontramos resultados diferentes en función de la técnica empleada. Mientras que con la técnica del *wound healing* no observamos que TGF $\beta$ 1 ejerza ningún papel en la migración, con la técnica de migración en *transwell* sí que observamos el efecto promigratorio de TGF $\beta$ 1. En cualquier caso, no observamos que la expresión de endoglina module la forma en que los fibroblastos responden a TGF $\beta$ 1.

Teniendo en cuenta el conjunto de todos nuestros resultados, parece que los efectos que produce la expresión de endoglina sobre las propiedades celulares de los MDF no se deben a una modulación de la respuesta a TGF $\beta$ . Pese a que describimos que este tipo celular también presenta activación de la ruta de Smad1/5, no hemos observado que endoglina altere la activación de las Smads, tal y como han descrito diferentes autores en otros tipos celulares. Tampoco hemos observado que la expresión de endoglina afecte a la forma en que se activan otros mediadores celulares como son las MAPKs o la vía de PI3K/Akt. Por último, nuestros resultados no muestran que el tratamiento con TGF $\beta$ 1 provoque efectos diferentes sobre la proliferación o la migración celular de los fibroblastos haploinsuficientes al compararlos con los controles. Como, sin embargo, sí que hemos observado que los fibroblastos *Eng*<sup>+/-</sup> tienen una mayor activación basal de Akt que los *Eng*<sup>+/+</sup>, decidimos analizar el efecto de la expresión de endoglina sobre la activación de Akt en fibroblastos.

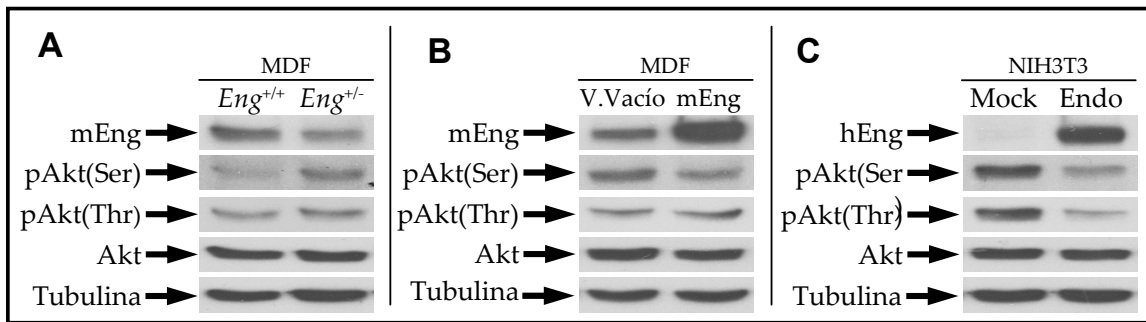
## 5. Efecto de la expresión de endoglina sobre la activación de Akt en fibroblastos

La ruta de PI3K/Akt juega un papel fundamental en la regulación de diferentes procesos celulares como son la apoptosis, el crecimiento celular, la proliferación y la migración (Cantley, 2002). Por lo tanto, esta vía podría estar implicada en las diferencias observadas en fibroblastos procedentes de ratones *Eng<sup>+/+</sup>* y *Eng<sup>+/-</sup>*. Además, como hemos descrito anteriormente, en nuestros fibroblastos parece que existe una diferente activación basal de Akt, el mediador central de la vía.

La activación de Akt se produce mediante su fosforilación en 2 residuos diferentes: Thr<sup>308</sup> y Ser<sup>473</sup>. La fosforilación en Thr<sup>308</sup> es suficiente para inducir una activación parcial de Akt, sin embargo, es necesaria la fosforilación en Ser<sup>473</sup> para que se produzca una activación completa (Song *et al.*, 2005). Por lo tanto, analizamos la fosforilación de Akt utilizando dos anticuerpos diferentes: uno que reconoce específicamente Akt fosforilado en Thr<sup>308</sup> y otro que reconoce la fosforilación en Ser<sup>473</sup>. Como las diferencias provocadas por la haploinsuficiencia las detectamos en condiciones basales con medio de cultivo con 10% de suero, para analizar la activación de Akt no utilizamos ningún estímulo, sino que trabajamos en condiciones basales. En esas condiciones, observamos que los MDF *Eng<sup>+/-</sup>* presentan una fosforilación en la Thr<sup>308</sup> de Akt ligeramente mayor que los *Eng<sup>+/+</sup>*. Al analizar la fosforilación de Akt en la Ser<sup>473</sup> vemos, de nuevo, que los MDF *Eng<sup>+/-</sup>* presentan una mayor fosforilación que los *Eng<sup>+/+</sup>*, pero en este caso las diferencias son mucho mayores (Figura 55A). Para comprobar si este efecto está directamente relacionado con la expresión de endoglina, sobreexpresamos endoglina en los fibroblastos y analizamos la activación de Akt. En primer lugar transfectamos los MDF de forma transitoria con un plásmido de expresión de endoglina murina (mEng) o con el vector vacío. La expresión de endoglina en estas células inhibe la fosforilación de Akt en la Ser<sup>473</sup>, sin embargo no somos capaces de detectar diferencias en la fosforilación de Akt en Thr<sup>308</sup> entre los MDF transfectados con el vector vacío o con mEng (Figura 55B). También, sobreexpresamos endoglina en fibroblastos NIH3T3,



infectándolos de forma estable con un plásmido de expresión de endoglina humana (hEng), y analizamos de nuevo la activación de Akt en estas células. La sobreexpresión de endoglina en los fibroblastos NIH3T3 inhibe, de forma muy importante, la fosforilación de Akt tanto en la Thr<sup>308</sup> como en la Ser<sup>473</sup> (Figura 55C).



**Figura 55. Efecto de la expresión de endoglina sobre la activación de Akt.** Analizamos la fosforilación de Akt en la Thr<sup>308</sup> y la Ser<sup>473</sup> en MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> (A), en MDF transfectados con endoglina murina (mEng) (B) y en fibroblastos NIH3T3 infectados con endoglina humana (hEng) (C). En cada experimento comprobamos la expresión de endoglina, de Akt total y utilizamos tubulina como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos.

Como resumen de estos resultados, podemos decir que existe una relación inversa entre la expresión de endoglina y la activación de Akt ya que los fibroblastos haploinsuficientes de endoglina presentan una mayor activación de Akt y la sobreexpresión de la proteína produce una menor activación. Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que la activación de Akt en fibroblastos es dependiente de la expresión de endoglina, pero aún habría que dilucidar el mecanismo molecular por el que esto sucede.

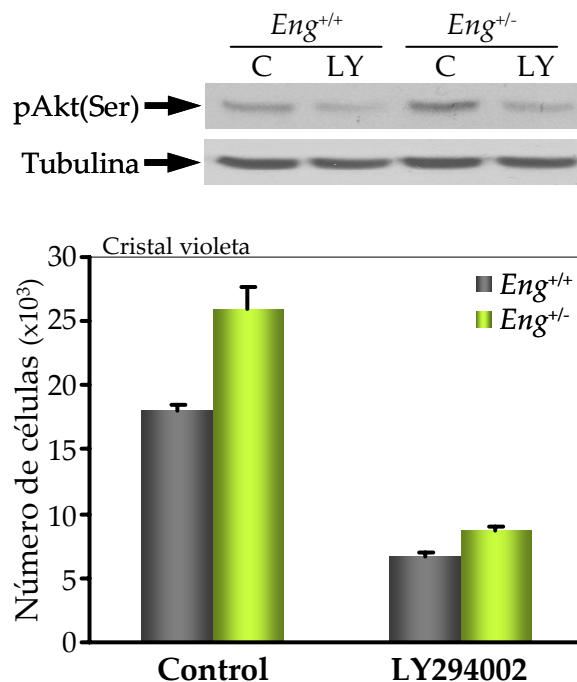
Aunque no existen en la literatura artículos que relacionen endoglina con PI3K o Akt, sí que encontramos cierta relación con el inhibidor de PI3K, PTEN, uno de los miembros más importantes en la ruta de señalización. Recientemente, se han descrito mutaciones en el gen de endoglina asociadas al Síndrome de Poliposis Juvenil (Sweet *et al.*, 2005). El Síndrome de Poliposis Juvenil es un enfermedad autosómica dominante muy infrecuente (1/100.000 habitantes) caracterizada por la aparición, a una edad muy temprana (5-6 años), de múltiples pólipos

hamartomatosos en las regiones proximal y colorrectal del intestino. En un 40% de los casos se ha asociado a la mutación de *SMAD4* o de *BMPRIA* (Receptor tipo I de BMP), aunque también se ha asociado a mutaciones en otros genes entre los que se encuentra el inhibidor de la actividad de PI3K, *PTEN* (Chow y Macrae, 2005). En algunos casos, la mutación de *SMAD4* provoca la aparición del síndrome denominado JP-HHT, que combina fenotipos de ambas enfermedades (Gallione *et al.*, 2004).

## 6. Efecto de Akt sobre la proliferación de los fibroblastos

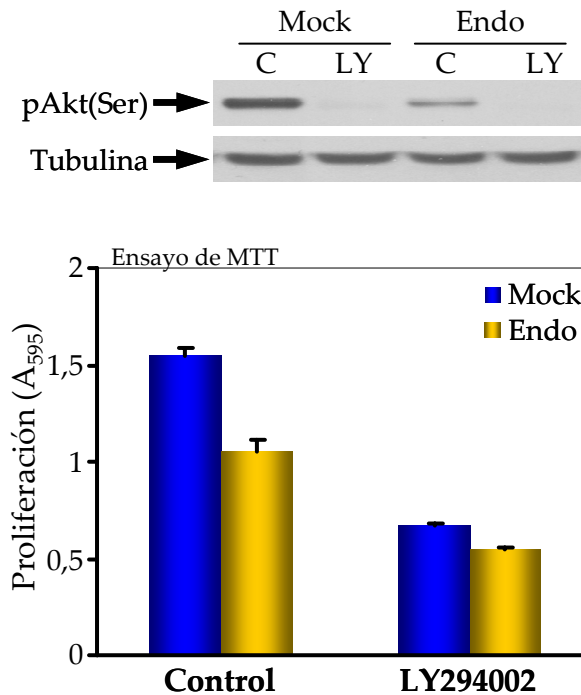
Diversos trabajos han relacionado la activación Akt con una mayor proliferación en fibroblastos (Collado *et al.*, 2000; Feutz *et al.*, 2008; Giacco *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta esto y que la expresión de endogлина modifica la proliferación en los fibroblastos, quisimos estudiar si las diferencias en proliferación encontradas entre los MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y los *Eng*<sup>+/-</sup> se deben de forma directa a la diferente activación de Akt. Para ello, analizamos el efecto del inhibidor de PI3K, LY294002, sobre la proliferación de los fibroblastos. El LY294002 es un inhibidor altamente selectivo de PI3K, por lo que es una herramienta muy importante en el estudio del papel biológico de la ruta de señalización PI3K/Akt (Collado *et al.*, 2000; Vlahos *et al.*, 1994). Si las diferencias en proliferación encontradas entre los fibroblastos *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> son consecuencia de la distinta activación de Akt, al tratar las células con el inhibidor esas diferencias deberían desaparecer.

Sembramos MDF *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> en placas de 24 pocillos, dejamos que las células se pegasen durante unas 12 horas y las tratamos, o no, con 10  $\mu$ M del inhibidor LY294002, administrado en una sola dosis inicial. En el momento de poner el tratamiento, se estimó el número de células que habíamos sembrado y no encontramos diferencias entre los 2 tipos celulares (datos no mostrados). Dejamos que las células proliferasen 4 días más y estimamos el número de células, mediante cristal violeta. Como era de esperar, en ausencia del tratamiento con el inhibidor LY294002, los fibroblastos deficientes en endogлина, que poseen una mayor activación de Akt, proliferan más que los fibroblastos control. Cuando tratamos las células con el inhibidor de PI3K, se observa un marcado efecto antiproliferativo en ambos tipos celulares que, además, elimina las diferencias observadas sin el tratamiento (Figura 56). Parece, por lo tanto, que la ruta de PI3K/Akt está implicada en el efecto inhibidor de endogлина sobre la proliferación de los fibroblastos.



**Figura 56. Efecto del LY294002 sobre la proliferación de los MDF  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ .** Para analizar el efecto del tratamiento con LY294002 sobre la proliferación celular, tratamos los MDF con una sola dosis de LY294002, administrada tras la siembra, y estimamos, mediante la técnica del cristal violeta, el número de células después de 4 días. Comprobamos, por *Western blot*, el efecto inhibitor del LY294002 sobre la activación de Akt. Para ello, analizamos la fosforilación de Akt en la Ser<sup>473</sup> y utilizamos la expresión de tubulina como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos.

Para confirmar que existe una relación directa entre la expresión de endoglina, la activación de Akt y la regulación de la proliferación celular en fibroblastos, analizamos el efecto del tratamiento con el LY294002 sobre la proliferación de los NIH3T3 infectados con el plásmido de expresión de endoglina humana. Tal y como hicimos con los MDF, sembramos las células, 12 horas después las tratamos con el LY294002 y estimamos, mediante la técnica del MTT, la proliferación celular a lo largo de 4 días. Obtuvimos unos resultados similares a los obtenidos con los MDF  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ . Las células que sobreexpresan endoglina proliferan menos que las infectadas con el vector vacío. Además, el tratamiento con el inhibidor de PI3K inhibe e iguala la proliferación de los dos tipos celulares (Figura 57).



**Figura 57. Efecto del LY294002 sobre la proliferación de los NIH3T3 infectados con endoglina.** Para analizar el efecto del tratamiento con LY294002 sobre la proliferación celular, tratamos los NIH3T3 con una sola dosis de LY294002, administrada tras la siembra, y estimamos, mediante MTT, el número de células después de 4 días. Comprobamos, por *Western blot*, el efecto inhibitorio del LY294002 sobre la activación de Akt. Para ello, analizamos la fosforilación de Akt en la Ser<sup>473</sup> y utilizamos la expresión de tubulina como control de carga. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos.

La ruta de PI3K/Akt ha cobrado una gran importancia a lo largo de los últimos años, ya que controla diversos procesos celulares relacionados con numerosas patologías. En este contexto, los inhibidores de la actividad de PI3K o de Akt se han convertido, no solo en un posible tratamiento para algunas enfermedades, sino en una valiosa herramienta preclínica que permite dilucidar el papel que juega esta vía en diferentes procesos fisiopatológicos. Aunque recientemente han aparecido inhibidores específicos de los diferentes componentes de la vía de señalización, los primeros inhibidores de PI3K descritos, Wortmanina y LY294002, son aún los más empleados para analizar el papel de esta vía en la regulación de diferentes propiedades celulares (LoPiccolo *et al.*, 2007; Marone *et al.*, 2008). De acuerdo con esto, nosotros hemos utilizado el inhibidor LY294002 para

analizar el efecto de la activación diferencial de Akt sobre la proliferación de los fibroblastos de piel. Comprobamos que el tratamiento con el inhibidor bloquea la activación de Akt y, así, desaparecen las diferencias debidas a la diferente expresión de endoglina de los MDF. Los fibroblastos tratados con el inhibidor proliferan menos que los no tratados, pero, además, el tratamiento con el inhibidor previene las diferencias de proliferación debidas a la expresión de endoglina. Por lo tanto, parece que Akt es un importante mediador del efecto de la expresión de endoglina sobre la proliferación celular.

Como ya hemos discutido, diferentes autores describen el efecto de endoglina sobre la proliferación (Lebrin *et al.*, 2004; Letamendia *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000b). Estos autores proponen que endoglina modifica la proliferación celular modulando la señalización de TGF $\beta$  a través de la vía clásica de las Smads y, por tanto, su efecto antiproliferativo. Sin embargo, nuestro trabajo demuestra, no solo que el efecto de la expresión de endoglina sobre los fibroblastos de piel es independiente de TGF $\beta$ , sino que, además, Akt está implicado en este efecto. Por supuesto, aún es necesario investigar cómo endoglina es capaz de modular la activación de Akt y si este efecto, además de modificar la proliferación celular, puede estar implicado en otros procesos celulares modificados por la expresión de endoglina. Además, ya que muchos de los efectos de endoglina son dependientes del tipo celular, también sería interesante estudiar el papel de endoglina en la activación de Akt en otros tipos celulares. Sin embargo, nuestros resultados presentan la ruta de PI3K/Akt como un nuevo mediador de los efectos celulares de endoglina, lo que puede ayudar a dilucidar el mecanismo molecular por el que endoglina participa en diferentes procesos fisiopatológicos.

Discusión final





La cicatrización de heridas es un proceso natural del organismo cuyo objetivo es la regeneración de los tejidos dañados. Una herida es una puerta abierta a la pérdida de líquidos corporales y a la entrada de patógenos, por lo que este proceso resulta imprescindible en la recuperación de traumatismos o intervenciones quirúrgicas. Por otro lado, diferentes patologías pueden inducir la aparición de heridas dérmicas de difícil cicatrización, como las úlceras de los pacientes diabéticos. Por lo tanto, un profundo conocimiento de los procesos y factores que forman parte de este proceso nos permitiría encontrar tratamientos que facilitasen la reparación del tejido en el menor tiempo posible. La correcta reparación de las heridas implica la recuperación tanto de las estructuras como de las propiedades fisicomecánicas propias de la piel normal. Este tipo de regeneración cutánea solo se da en heridas embrionarias, sin embargo, existen numerosos factores que influyen en que la reparación una herida produzca una cicatriz más funcional o una cicatriz hipertrofiada o queloide. La formación de cicatrices hipertróficas, implica no solo la pérdida del correcto funcionamiento de la piel, sino que, además, puede tener graves implicaciones dolorosas y estéticas para el paciente. Por esta razón, en los últimos años se ha desarrollado el interés por la búsqueda de tratamientos que permitan tanto acelerar la cicatrización como evitar la aparición de cicatrices hipertróficas (Ferguson y O'Kane, 2004; Hinz, 2007; Singer y Clark, 1999; Werner y Grose, 2003).

Este trabajo demuestra que la deficiencia de endoglina provoca un retraso en los primeros estadios de la cicatrización, observable tanto mediante el análisis macroscópico a los 2 y 4 días después de la lesión, como con el análisis histológico del día 6. Este retraso puede deberse a la que los ratones haploinsuficientes de endoglina tienen una vasodilatación deficiente (Jerkic *et al.*, 2004), lo que puede afectar al desarrollo de la fase inflamatoria de la cicatrización. Los ratones haploinsuficientes también presentan alteraciones en la angiogénesis (Jerkic *et al.*, 2006b) que pueden afectar a la formación del tejido granular y al reclutamiento de nuevas células inflamatorias. Pero, por otro lado, nuestros resultados muestran una mayor presencia de miofibroblastos en las heridas de los ratones haploinsuficientes, que, además, forman cicatrices más fibrosas a los 12 días de producirse la herida. La

acumulación de miofibroblastos en la herida está relacionada con la aparición de cicatrices hipertróficas y de queloides que impide la correcta regeneración funcional del tejido. Por lo tanto, si controlando la expresión de endogлина podemos regular la acumulación de miofibroblastos en la herida, nos encontraríamos ante una posible aproximación terapéutica al problema de la formación de cicatrices hipertróficas.

Para poder profundizar en el efecto de endogлина sobre la acumulación de miofibroblastos en la herida, hemos desarrollado un modelo celular *in vitro*, el cultivo primario de fibroblastos procedentes de la dermis de ratones *Eng<sup>+/-</sup>*. Estos fibroblastos expresan, aproximadamente, la mitad de endogлина que los controles, por lo que podemos, de esta forma, estudiar el efecto de la expresión de endogлина sobre diferentes procesos celulares. Nuestros resultados demuestran que la expresión de endogлина inhibe la proliferación, la migración y la síntesis de componentes de la matriz extracelular en los fibroblastos. Estos procesos pueden estar implicados, no solo en la acumulación de un mayor número de miofibroblastos en las heridas de los ratones haploinsuficientes, sino que pueden explicar porqué las heridas de estos ratones son más fibróticas.

En este trabajo, demostramos que endogлина reduce la proliferación, la migración y la síntesis de matriz extracelular de los fibroblastos de piel. De esta forma, parece que el efecto de endogлина sobre estas propiedades celulares es dependiente del tipo celular, ya que otros autores han descrito previamente el efecto pro-proliferativo de endogлина en diferentes tipos celulares (Fernandez-L *et al.*, 2007; Jerkic *et al.*, 2006b; Lebrin *et al.*, 2004; Perez-Gomez *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2008). Por lo tanto, resulta muy interesante analizar a nivel molecular la forma en que endogлина regula estos procesos. La mayor parte de los trabajos publicados relacionan el efecto de endogлина con una regulación de los procesos celulares modulados por TGF $\beta$  (Lebrin *et al.*, 2004; Letamendia *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000b). Según el modelo propuesto, endogлина promueve la señalización de TGF $\beta$ 1 a través de ALK1-Smad1/5 e inhibe la señalización a través de ALK5-Smad2/3 (Lebrin *et al.*, 2004; Velasco *et al.*, 2008). Este cambio en la señalización intracelular del TGF $\beta$ 1 provoca un cambio en la respuesta celular a TGF $\beta$ 1 que pasa de ser un factor anti-proliferativo y pro-fibrótico a ser pro-proliferativo y anti-fibrótico. Sin embargo,

estas vías de señalización se han considerado clásicamente exclusivas del endotelio, por lo que no se había descrito la existencia de estas dos vías de señalización en fibroblastos de piel y, solo recientemente, se ha descrito la funcionalidad de ambas vías en fibroblastos NIH3T3 (Daly *et al.*, 2008). Nuestros resultados demuestran que ambas vías están presentes y son funcionales en los fibroblastos de piel. Sin embargo, su activación es independiente de la expresión de endogлина. Además, la expresión de endogлина no modula las respuestas celulares a TGF $\beta$ 1, por lo que el efecto de endogлина sobre las propiedades biológicas de los fibroblastos parece que es independiente de la señalización de TGF $\beta$ . A pesar de que endogлина tampoco modula la señalización de TGF $\beta$ 1 a través de las rutas de MAPKs o de PI3K/Akt, nuestros resultados demuestran que la expresión de endogлина inhibe la activación de Akt en condiciones basales.

La ruta de PI3K/Akt participa en la regulación de diferentes procesos celulares como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular, por lo que está implicado en la aparición y el desarrollo de múltiples patologías. Por esta razón, el estudio de la regulación de esta vía ha cobrado una gran importancia como aproximación terapéutica a algunas de esas patologías (Marone *et al.*, 2008; Vivanco y Sawyers, 2002). Nuestros resultados demuestran que la expresión de endogлина inhibe la activación de la ruta de PI3K/Akt, ya que las células haploinsuficientes de endogлина tienen mayor fosforilación basal de Akt. Además, esta diferente activación basal de Akt es la que media el efecto inhibitorio de endogлина sobre la proliferación de los fibroblastos. Por lo tanto, no solo demostramos que endogлина regula la activación de Akt, sino que la ruta de PI3K/Akt media los efectos celulares de endogлина por un mecanismo independiente de TGF $\beta$ 1.

En definitiva, este trabajo demuestra que el control de la expresión de endogлина es importante en la cicatrización y que, por lo tanto, sería interesante buscar terapias basadas en el incremento de endogлина en la herida que facilitasen una reparación del tejido dañado más rápida y funcional. Además, demostramos que los efectos celulares de endogлина pueden ser independientes de TGF $\beta$ 1 y proponemos a PI3K/Akt como una ruta a tener en consideración a la hora de intentar desentrañar los efectos celulares de endogлина.



# Conclusiones



A partir de los resultados expuestos en este trabajo, extraemos las siguientes conclusiones:

1. La haploinsuficiencia de endoglina produce una cicatrización deficiente, caracterizada por el retraso en la formación de la capa de epidermis, la acumulación de miofibroblastos y la formación de una cicatriz fibrosa e inmadura.
2. Endoglina reduce la proliferación, la migración y la síntesis de componentes de la matriz extracelular en los fibroblastos de piel.
3. TGF $\beta$ 1 activa las vías de señalización de Smad2/3 y de Smad1/5 en los fibroblastos de piel.
4. El efecto biológico y la señalización celular de TGF $\beta$ 1 son independientes de endoglina en los fibroblastos de piel.
5. Endoglina reduce la activación de la vía de PI3K/Akt en los fibroblastos de piel.
6. La regulación de la proliferación celular por endoglina está mediada por la vía de PI3K/Akt.





# Bibliografía



Abdalla, S. A., Geisthoff, U. W., Bonneau, D., Plauchu, H., McDonald, J., Kennedy, S., Faughnan, M. E. y Letarte, M. (2003). Visceral manifestations in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *J Med Genet* **40**, 494-502.

Abdalla, S. A. y Letarte, M. (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* **43**, 97-110.

Abdalla, S. A., Pece-Barbara, N., Vera, S., Tapia, E., Paez, E., Bernabeu, C. y Letarte, M. (2000). Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* **9**, 1227-1237.

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.

Akagi, K., Ikeda, Y., Sumiyoshi, Y., Kimura, Y., Kinoshita, J., Miyazaki, M. y Abe, T. (2002). Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* **131**, S109-113.

Alberts, B. (1996). *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega.

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.

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. *et al.* (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* **217**, 42-53.

Ashcroft, G. S., Yang, X., Glick, A. B., Weinstein, M., Letterio, J. L., Mizel, D. E., Anzano, M., Greenwell-Wild, T., Wahl, S. M., Deng, C. *et al.* (1999). Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* **1**, 260-266.

Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L. y Vogt, P. K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* **5**, 921-929.

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.

Bayrak-Toydemir, P., McDonald, J., Akarsu, N., Toydemir, R. M., Calderon, F., Tuncali, T., Tang, W., Miller, F. y Mao, R. (2006). A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A* **140**, 2155-2162.

**Bellon, T., Corbi, A., Lastres, P., Cales, C., Cebrian, M., Vera, S., Cheifetz, S., Massague, J., Letarte, M. y Bernabeu, 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.

**Bhaskar, P. T. y Hay, N.** (2007). The two TORCs and Akt. *Dev Cell* **12**, 487-502.

**Blanco, F. J., Grande, M. T., Langa, C., Oujo, B., Velasco, S., Rodriguez-Barbero, A., Perez-Gomez, E., Quintanilla, M., Lopez-Novoa, J. M. y Bernabeu, C.** (2008). S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* **103**, 1383-1392.

**Blanco, F. J., Santibanez, J. F., Guerrero-Esteo, M., Langa, C., Vary, C. P. y Bernabeu, 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* **204**, 574-584.

**Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S. E. y Kaiser, H. E.** (1998a). Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. *Anticancer Res* **18**, 2701-2710.

**Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S. E. y Kaiser, H. E.** (1998b). Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization. *Anticancer Res* **18**, 3621-3628.

**Bodey, B., Bodey, B., Jr., Siegel, S. E. y Kaiser, H. E.** (1998c). Upregulation of endoglin (CD105) expression during childhood brain tumor-related angiogenesis. Anti-angiogenic therapy. *Anticancer Res* **18**, 1485-1500.

**Botella, L. M., Sanchez-Elsner, T., Rius, C., Corbi, A. y Bernabeu, 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.

**Botella, L. M., Sanchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman, M. P., Ratziu, V., Langa, C., Vary, C. P. et al.** (2002). Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* **100**, 4001-4010.

**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.

**Bourdeau, A., Dumont, D. J. y Letarte, M.** (1999). A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* **104**, 1343-1351.

- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- 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.
- Braiman-Wiksman, L., Solomonik, I., Spira, R. y Tennenbaum, T.** (2007). Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol* **35**, 767-779.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A. y Macdonald-Bravo, H.** (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* **326**, 515-517.
- Brewer, C. A., Setterdahl, J. J., Li, M. J., Johnston, J. M., Mann, J. L. y McAsey, M. E.** (2000). Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet Gynecol* **96**, 224-228.
- Brown, E. J.** (1995). Phagocytosis. *Bioessays* **17**, 109-117.
- Buhring, H. J., Muller, C. A., Letarte, M., Gougos, A., Saalmuller, A., van Agthoven, A. J. y Busch, F. W.** (1991). Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia* **5**, 841-847.
- 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.
- Cantley, L. C.** (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657.
- Cantrell, D. A.** (2001). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* **114**, 1439-1445.
- Cole, S. G., Begbie, M. E., Wallace, G. M. y Shovlin, C. L.** (2005). A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* **42**, 577-582.
- Collado, M., Medema, R. H., Garcia-Cao, I., Dubuisson, M. L., Barradas, M., Glassford, J., Rivas, C., Burgering, B. M., Serrano, M. y Lam, E. W.** (2000). Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* **275**, 21960-21968.

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., Bernabeu, 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.

Craft, C. S., Romero, D., Vary, C. P. y Bergan, R. C. (2007). Endoglin inhibits prostate cancer motility via activation of the ALK2-Smad1 pathway. *Oncogene* **26**, 7240-7250.

Cruz-Gonzalez, I., Pabon, P., Rodriguez-Barbero, A., Martin-Moreiras, J., Pericacho, M., Sanchez, P. L., Ramirez, V., Sanchez-Ledesma, M., Martin-Herrero, F., Jimenez-Candil, J. *et al.* (2008). Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med* **12**, 955-961.

Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, 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.

Chien, C. Y., Su, C. Y., Hwang, C. F., Chuang, H. C., Chen, C. M. y Huang, C. C. (2006). High expressions of CD105 and VEGF in early oral cancer predict potential cervical metastasis. *J Surg Oncol* **94**, 413-417.

Chow, E. y Macrae, F. (2005). A review of juvenile polyposis syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* **20**, 1634-1640.

Daly, A. C., Randall, R. A. y Hill, C. S. (2008). Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* **28**, 6889-6902.

David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J. y Bailly, S. (2007a). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**, 1953-1961.

David, L., Mallet, C., Vailhe, B., Lamouille, S., Feige, J. J. y Bailly, S. (2007b). Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration: potential roles for JNK and ERK. *J Cell Physiol* **213**, 484-489.

Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. y Gauthier, J. M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J* **17**, 3091-3100.

Derynck, R. y Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-584.

- Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. y Gabbiani, G.** (1993). Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **122**, 103-111.
- Desmouliere, A., Guyot, C. y Gabbiani, G.** (2004). The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* **48**, 509-517.
- 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.
- Diez-Marques, L., Ortega-Velazquez, R., Langa, C., Rodriguez-Barbero, A., Lopez-Novoa, J. M., Lamas, S. y Bernabeu, C.** (2002). Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1587**, 36-44.
- 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.
- Duwel, A., Eleno, N., Jerkic, M., Arevalo, M., Bolanos, J. P., Bernabeu, C. y Lopez-Novoa, J. M.** (2007). Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice. *Tumour Biol* **28**, 1-8.
- Ehrlich, H. P., Desmouliere, A., Diegelmann, R. F., Cohen, I. K., Compton, C. C., Garner, W. L., Kapanci, Y. y Gabbiani, G.** (1994). Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol* **145**, 105-113.
- Ehrlich, H. P., Keefer, K. A., Myers, R. L. y Passaniti, A.** (1999). Vanadate and the absence of myofibroblasts in wound contraction. *Arch Surg* **134**, 494-501.
- Erdem, O., Taskiran, C., Onan, M. A., Erdem, M., Guner, H. y Ataoglu, O.** (2006). CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol* **103**, 1007-1011.
- Ferguson, M. W. y O'Kane, S.** (2004). Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 839-850.
- Fernandez-L, A., Garrido-Martin, E. M., Sanz-Rodriguez, F., Pericacho, M., Rodriguez-Barbero, A., Eleno, N., Lopez-Novoa, J. M., Duwell, A., Vega, M. A., Bernabeu, C. et al.** (2007). Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mol Genet* **16**, 1515-1533.
- Fernandez-L, A., Sanz-Rodriguez, F., Blanco, F. J., Bernabeu, C. y Botella, L. M.** (2006a). Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res* **4**, 66-78.

Fernandez-L, A., Sanz-Rodriguez, F., Zarrabeitia, R., Perez-Molino, A., Hebbel, R. P., Nguyen, J., Bernabeu, C. y Botella, L. M. (2005). Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res* **68**, 235-248.

Fernandez-L, A., Sanz-Rodriguez, F., Zarrabeitia, R., Perez-Molino, A., Morales, C., Restrepo, C. M., Ramirez, J. R., Coto, E., Lenato, G. M., Bernabeu, C. *et al.* (2006b). Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and ALK1. *Hum Mutat* **27**, 295.

Fernandez-Ruiz, E., St-Jacques, S., Bellon, T., Letarte, M. y Bernabeu, C. (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet* **64**, 204-207.

Feutz, A. C., Barrandon, Y. y Monard, D. (2008). Control of thrombin signaling through PI3K is a mechanism underlying plasticity between hair follicle dermal sheath and papilla cells. *J Cell Sci* **121**, 1435-1443.

Finnson, K. W., Parker, W. L., ten Dijke, P., Thorikay, M. y Philip, A. (2008). ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res* **23**, 896-906.

Fonsatti, E., Altomonte, M., Nicotra, M. R., Natali, P. G. y Maio, M. (2003). Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* **22**, 6557-6563.

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.

Fontalba, A., Fernandez, L. A., Garcia-Alegria, E., Albinana, V., Garrido-Martin, E. M., Blanco, F. J., Zarrabeitia, R., Perez-Molino, A., Bernabeu-Herrero, M. E., Ojeda, M. L. *et al.* (2008). Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *BMC Med Genet* **9**, 75.

Fujimoto, M., Hasegawa, M., Hamaguchi, Y., Komura, K., Matsushita, T., Yanaba, K., Koderu, M., Takehara, K. y Sato, S. (2006). A clue for telangiectasis in systemic sclerosis: elevated serum soluble endoglin levels in patients with the limited cutaneous form of the disease. *Dermatology* **213**, 88-92.

Gallione, C. J., Repetto, G. M., Legius, E., Rustgi, A. K., Schelley, S. L., Tejpar, S., Mitchell, G., Drouin, E., Westermann, C. J. y Marchuk, D. A. (2004). A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* **363**, 852-859.

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.



**Ghahary, A., Shen, Y. J., Scott, P. G., Gong, Y. y Tredget, E. E.** (1993). Enhanced expression of mRNA for transforming growth factor-beta, type I and type III procollagen in human post-burn hypertrophic scar tissues. *J Lab Clin Med* **122**, 465-473.

**Giacco, F., Perruolo, G., D'Agostino, E., Fratellanza, G., Perna, E., Misso, S., Saldalamacchia, G., Oriente, F., Fiory, F., Miele, C. et al.** (2006). Thrombin-activated platelets induce proliferation of human skin fibroblasts by stimulating autocrine production of insulin-like growth factor-1. *Faseb J* **20**, 2402-2404.

**Giannouli, C. C. y Kletsas, D.** (2006). TGF-beta regulates differentially the proliferation of fetal and adult human skin fibroblasts via the activation of PKA and the autocrine action of FGF-2. *Cell Signal* **18**, 1417-1429.

**Gougos, A. y Letarte, M.** (1988a). Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol* **141**, 1934-1940.

**Gougos, A. y Letarte, M.** (1988b). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* **141**, 1925-1933.

**Gougos, A. y Letarte, M.** (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* **265**, 8361-8364.

**Gougos, A., St Jacques, S., Greaves, A., O'Connell, P. J., d'Apice, A. J., Buhning, H. J., Bernabeu, C., van Mourik, J. A. y Letarte, M.** (1992). Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol* **4**, 83-92.

**Goumans, M. J., Lebrin, F. y Valdimarsdottir, G.** (2003a). Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- $\beta$  receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* **13**, 301-307.

**Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S. y ten Dijke, P.** (2003b). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF $\beta$ /ALK5 signaling. *Mol Cell* **12**, 817-828.

**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.

**Grinnell, F.** (1994). Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* **124**, 401-404.

**Guerrero-Esteo, M., Lastres, P., Letamendia, A., Perez-Alvarez, M. J., Langa, C., Lopez, L. A., Fabra, A., Garcia-Pardo, A., Vera, S., Letarte, M. et al.** (1999). Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* **78**, 614-623.

- Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A. y Bernabeu, 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., Bernabeu, C. y Kumar, S.** (2004). CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling. *Anticancer Res* **24**, 1337-1345.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. y Longaker, M. T.** (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321.
- Hinz, B.** (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* **127**, 526-537.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L. y Gabbiani, G.** (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* **170**, 1807-1816.
- Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Ruther, U. y Nordheim, A.** (1999). Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem* **274**, 19838-19845.
- 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.
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J. y Hill, C. S.** (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* **62**, 65-74.
- Izzi, L. y Attisano, L.** (2006). Ubiquitin-dependent regulation of TGFbeta signaling in cancer. *Neoplasia* **8**, 677-688.
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J. V., Prieto, M., Carron, R., Sanz-Rodriguez, F., Perez-Barriocanal, F., Rodriguez-Barbero, A., Bernabeu, C. y Lopez-Novoa, J. M.** (2004). Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J* **18**, 609-611.
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J. V., Santibanez, J. F., Prieto, M., Rodriguez-Barbero, A., Perez-Barriocanal, F., Pericacho, M., Arevalo, M., Vary, C. P., Letarte, M. et al.** (2006a). Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res* **99**, 248-256.
- Jerkic, M., Rodriguez-Barbero, A., Prieto, M., Toporsian, M., Pericacho, M., Rivas-Elena, J. V., Obreo, J., Wang, A., Perez-Barriocanal, F., Arevalo, M. et al.** (2006b). Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* **69**, 845-854.

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. *et al.* (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* **13**, 189-195.

Jovine, L., Darie, C. C., Litscher, E. S. y Wassarman, P. M. (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* **74**, 83-114.

Kang, Y., Hebron, H., Ozbun, L., Mariano, J., Minoo, P. y Jakowlew, S. B. (2004). Nkx2.1 transcription factor in lung cells and a transforming growth factor-beta1 heterozygous mouse model of lung carcinogenesis. *Mol Carcinog* **40**, 212-231.

Kassouf, W., Ismail, H. R., Aprikian, A. G. y Chevalier, S. (2004). Whole-mount prostate sections reveal differential endoglin expression in stromal, epithelial, and endothelial cells with the development of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **7**, 105-110.

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.

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.

Koleva, R. I., Conley, B. A., Romero, D., Riley, K. S., Marto, J. A., Lux, A. y Vary, C. P. (2006). Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* **281**, 25110-25123.

Konig, H. G., Kogel, D., Rami, A. y Prehn, J. H. (2005). TGF- $\beta$ 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- $\kappa$ B signaling. *J Cell Biol* **168**, 1077-1086.

Korchynskyi, O. y ten Dijke, P. (2002). Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* **277**, 4883-4891.

Kulesz-Martin, M., Kilkenny, A. E., Holbrook, K. A., Digernes, V. y Yuspa, S. H. (1983). Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium-induced terminal differentiation. *Carcinogenesis* **4**, 1367-1377.

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.

- Kyzas, P. A., Agnantis, N. J. y Stefanou, D. (2006). Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* **448**, 768-775.
- Labbe, E., Silvestri, C., Hoodless, P. A., Wrana, J. L. y Attisano, L. (1998). Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* **2**, 109-120.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A. y Massague, J. (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* **383**, 832-836.
- Laping, N. J., Grygielko, E., Mathur, A., Butter, S., Bomberger, J., Tweed, C., Martin, W., Fornwald, J., Lehr, R., Harling, J. *et al.* (2002). Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* **62**, 58-64.
- Lastella, P., Sabba, C., Lenato, G. M., Resta, N., Lattanzi, W., Gallitelli, M., Cirulli, A. y Guanti, G. (2003). Endoglin gene mutations and polymorphisms in Italian patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet* **63**, 536-540.
- Lastres, P., Bellon, T., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., Acevedo, A., Gougos, A., Letarte, M. y Bernabeu, C. (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* **22**, 393-397.
- Lastres, P., Letamendia, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., Lopez, L. A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M. *et al.* (1996). Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* **133**, 1109-1121.
- Lastres, P., Martin-Perez, J., Langa, C. y Bernabeu, C. (1994). Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J* **301** ( Pt 3), 765-768.
- Leask, A., Abraham, D. J., Finlay, D. R., Holmes, A., Pennington, D., Shi-Wen, X., Chen, Y., Venstrom, K., Dou, X., Ponticos, M. *et al.* (2002). Dysregulation of transforming growth factor beta signaling in scleroderma: overexpression of endoglin in cutaneous scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **46**, 1857-1865.
- Leask, A., Denton, C. P. y Abraham, D. J. (2004). Insights into the molecular mechanism of chronic fibrosis: the role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J Invest Dermatol* **122**, 1-6.
- 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.

Lebrin, F. y Mummery, C. L. (2008). Endoglin-mediated vascular remodeling: mechanisms underlying hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med* **18**, 25-32.

Lee, N. Y. y Blobel, G. C. (2007). The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor-beta-mediated ERK activation and migration in endothelial cells. *J Biol Chem* **282**, 21507-21517.

Lee, N. Y., Ray, B., How, T. y Blobel, G. C. (2008). Endoglin promotes transforming growth factor beta-mediated Smad 1/5/8 signaling and inhibits endothelial cell migration through its association with GIPC. *J Biol Chem* **283**, 32527-32533.

Lesca, G., Burnichon, N., Raux, G., Tosi, M., Pinson, S., Marion, M. J., Babin, E., Gilbert-Dussardier, B., Riviere, S., Goizet, C. *et al.* (2006). Distribution of ENG and ACVRL1 (ALK1) mutations in French HHT patients. *Hum Mutat* **27**, 598.

Letamendia, A., Lastres, P., Almendro, N., Raab, U., Buhning, H. J., Kumar, S. y Bernabeu, C. (1998a). Endoglin, a component of the TGF-beta receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells. *Int J Cancer* **76**, 541-546.

Letamendia, A., Lastres, P., Botella, L. M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Attisano, L. y Bernabeu, C. (1998b). Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* **273**, 33011-33019.

Letarte, M., McDonald, M. L., Li, C., Kathirkamathamby, K., Vera, S., Pece-Barbara, N. y Kumar, S. (2005). Reduced endothelial secretion and plasma levels of transforming growth factor-beta1 in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Cardiovasc Res* **68**, 155-164.

Letteboer, T. G., Zewald, R. A., Kamping, E. J., de Haas, G., Mager, J. J., Snijder, R. J., Lindhout, D., Hennekam, F. A., Westermann, C. J. y Ploos van Amstel, J. K. (2005). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet* **116**, 8-16.

Levine, R. J., Lam, C., Qian, C., Yu, K. F., Maynard, S. E., Sachs, B. P., Sibai, B. M., Epstein, F. H., Romero, R., Thadhani, R. *et al.* (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* **355**, 992-1005.

Li, C., Guo, B., Wilson, P. B., Stewart, A., Byrne, G., Bundred, N. y Kumar, S. (2000a). Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* **89**, 122-126.

- Li, C., Hampson, I. N., Hampson, L., Kumar, P., Bernabeu, C. y Kumar, S. (2000b). 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., Lopez-Novoa, J. M., Bernabeu, C. y Kumar, S. (2003). CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci* **116**, 2677-2685.
- Li, C., Wang, J., Wilson, P. B., Kumar, P., Levine, E., Hunter, R. D. y Kumar, S. (1998). Role of transforming growth factor beta3 in lymphatic metastasis in breast cancer. *Int J Cancer* **79**, 455-459.
- 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.
- Lin, R. Y., Sullivan, K. M., Argenta, P. A., Meuli, M., Lorenz, H. P. y Adzick, N. S. (1995). Exogenous transforming growth factor-beta amplifies its own expression and induces scar formation in a model of human fetal skin repair. *Ann Surg* **222**, 146-154.
- Liu, I. M., Schilling, S. H., Knouse, K. A., Choy, L., Derynck, R. y Wang, X. F. (2009). TGFbeta-stimulated Smad1/5 phosphorylation requires the ALK5 L45 loop and mediates the pro-migratory TGFbeta switch. *Embo J* **28**, 88-98.
- Liu, Y., Jovanovic, B., Pins, M., Lee, C. y Bergan, R. C. (2002). Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene* **21**, 8272-8281.
- LoPiccolo, J., Granville, C. A., Gills, J. J. y Dennis, P. A. (2007). Targeting Akt in cancer therapy. *Anticancer Drugs* **18**, 861-874.
- Lux, A., Gallione, C. J. y Marchuk, D. A. (2000). Expression analysis of endoglin missense and truncation mutations: insights into protein structure and disease mechanisms. *Hum Mol Genet* **9**, 745-755.
- Llorca, O., Trujillo, A., Blanco, F. J. y Bernabeu, C. (2007). Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* **365**, 694-705.
- 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.
- Maegawa, H., Hasegawa, M., Sugai, S., Obata, T., Ugi, S., Morino, K., Egawa, K., Fujita, T., Sakamoto, T., Nishio, Y. *et al.* (1999). Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. *J Biol Chem* **274**, 30236-30243.

- Marazuela, M., Sanchez-Madrid, F., Acevedo, A., Larranaga, E. y de Landazuri, M. O.** (1995). Expression of vascular adhesion molecules on human endothelia in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol* **102**, 328-334.
- Marchuk, D. A.** (1998). Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Opin Hematol* **5**, 332-338.
- Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. y Wymann, M. P.** (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 159-185.
- Martin, P.** (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81.
- Massague, J.** (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 597-641.
- Massague, J.** (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-791.
- Massague, J. y Gomis, R. R.** (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* **580**, 2811-2820.
- Massague, J., Seoane, J. y Wotton, D.** (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783-2810.
- McAnulty, R. J.** (2007). Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 666-671.
- McGrath, J. A., Eady, R. A. J. y Pope, F. M.** (2008). Anatomy and Organization of Human Skin. In *Rook's Textbook of Dermatology (Seventh Edition)*, (eds T. Burns S. Breathnach N. Cox y C. Griffiths), pp. 45-128.
- Meurer, S. K., Tihaa, L., Lahme, B., Gressner, A. M. y Weiskirchen, R.** (2005). Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem* **280**, 3078-3087.
- 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.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T. y Miyazono, K.** (2002). Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* **7**, 1191-1204.
- Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Moustakas, A. y Heldin, C. H.** (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **118**, 3573-3584.

Neri, L. M., Borgatti, P., Capitani, S. y Martelli, A. M. (2002). The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta* **1584**, 73-80.

O'Connell, P. J., McKenzie, A., Fiscaro, N., Rockman, S. P., Pearse, M. J. y d'Apice, A. J. (1992). Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* **90**, 154-159.

Obreo, J., Diez-Marques, L., Lamas, S., Duwell, A., Eleno, N., Bernabeu, C., Pandiella, A., Lopez-Novoa, J. M. y Rodriguez-Barbero, A. (2004). Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts. *Cell Physiol Biochem* **14**, 301-310.

Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S. *et al.* (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2626-2631.

Oxmann, D., Held-Feindt, J., Stark, A. M., Hattermann, K., Yoneda, T. y Mentlein, R. (2008). Endoglin expression in metastatic breast cancer cells enhances their invasive phenotype. *Oncogene* **27**, 3567-3575.

Parker, W. L., Goldring, M. B. y Philip, A. (2003). Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFbeta receptor independent manner. *J Bone Miner Res* **18**, 289-302.

Pece-Barbara, N., Vera, S., Kathirkamathamby, K., Liebner, S., Di Guglielmo, G. M., Dejana, E., Wrana, J. L. y Letarte, M. (2005). Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem* **280**, 27800-27808.

Peinado, H., Quintanilla, M. y Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **278**, 21113-21123.

Pepper, M. S. (1997). Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**, 21-43.

Perez-Gomez, E., Villa-Morales, M., Santos, J., Fernandez-Piqueras, J., Gamallo, C., Dotor, J., Bernabeu, C. y Quintanilla, M. (2007). A role for endoglin as a suppressor of malignancy during mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **67**, 10268-10277.

Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engstrom, U., Heldin, C. H., Funahashi, K. y ten Dijke, P. (1998). The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett* **434**, 83-87.



- Postlethwaite, A. E., Keski-Oja, J., Moses, H. L. y Kang, A. H. (1987). Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* **165**, 251-256.
- Pruneri, G., Bertolini, F., Baldini, L., Valentini, S., Goldaniga, M., Soligo, D., Carboni, N., Viale, G. y Lambertenghi-Delilieri, G. (2003). Angiogenesis occurs in hairy cell leukaemia (HCL) and in NOD/SCID mice transplanted with the HCL line Bonna-12. *Br J Haematol* **120**, 695-698.
- Pruneri, G., Ponzoni, M., Ferreri, A. J., Decarli, N., Tresoldi, M., Raggi, F., Baldessari, C., Freschi, M., Baldini, L., Goldaniga, M. *et al.* (2002). Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* **118**, 817-820.
- 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.
- Quintanilla, M., Haddow, S., Jonas, D., Jaffe, D., Bowden, G. T. y Balmain, A. (1991). Comparison of ras activation during epidermal carcinogenesis in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **12**, 1875-1881.
- Quintanilla, M., Ramirez, J. R., Perez-Gomez, E., Romero, D., Velasco, B., Letarte, M., Lopez-Novoa, J. M. y Bernabeu, C. (2003). Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* **22**, 5976-5985.
- Qureshi, S. T., Gros, P., Letarte, M. y Malo, D. (1995). The murine endoglin gene (Eng) maps to chromosome 2. *Genomics* **26**, 165-166.
- Reiss, M. y Barcellos-Hoff, M. H. (1997). Transforming growth factor-beta in breast cancer: a working hypothesis. *Breast Cancer Res Treat* **45**, 81-95.
- Roberts, E. C., Shapiro, P. S., Nahreini, T. S., Pages, G., Pouyssegur, J. y Ahn, N. G. (2002). Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Mol Cell Biol* **22**, 7226-7241.
- Robledo, M. M., Hidalgo, A., Lastres, P., Arroyo, A. G., Bernabeu, C., Sanchez-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.
- Robledo, M. M., Ursa, M. A., Sanchez-Madrid, F. y Teixido, J. (1998). Associations between TGF-beta1 receptors in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol* **102**, 804-811.
- Rodriguez-Barbero, A., Obreo, J., Alvarez-Munoz, P., Pandiella, A., Bernabeu, C. y Lopez-Novoa, J. M. (2006). Endoglin modulation of TGF-beta1-induced collagen synthesis is dependent on ERK1/2 MAPK activation. *Cell Physiol Biochem* **18**, 135-142.

- Rodriguez-Barbero, A., Obreo, J., Eleno, N., Rodriguez-Pena, A., Duwel, A., Jerkic, M., Sanchez-Rodriguez, A., Bernabeu, C. y Lopez-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.
- Rodriguez-Pena, A., Eleno, N., Duwell, A., Arevalo, M., Perez-Barriocanal, F., Flores, O., Docherty, N., Bernabeu, C., Letarte, M. y Lopez-Novoa, J. M. (2002). Endoglin upregulation during experimental renal interstitial fibrosis in mice. *Hypertension* **40**, 713-720.
- Rodriguez-Pena, A., Prieto, M., Duwel, A., Rivas, J. V., Eleno, N., Perez-Barriocanal, F., Arevalo, M., Smith, J. D., Vary, C. P., Bernabeu, C. *et al.* (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.
- Romani, A. A., Borghetti, A. F., Del Rio, P., Sianesi, M. y Soliani, P. (2006). The risk of developing metastatic disease in colorectal cancer is related to CD105-positive vessel count. *J Surg Oncol* **93**, 446-455.
- 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.
- Rulo, H. F., Westphal, J. R., van de Kerkhof, P. C., de Waal, R. M., van Vlijmen, I. M. y Ruiter, 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.
- Saad, R. S., El-Gohary, Y., Memari, E., Liu, Y. L. y Silverman, J. F. (2005). Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol* **36**, 955-961.
- Saad, R. S., Jasnosz, K. M., Tung, M. Y. y Silverman, J. F. (2003). Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* **22**, 248-253.
- Saad, R. S., Liu, Y. L., Nathan, G., Celebrezze, J., Medich, D. y Silverman, J. F. (2004). Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol* **17**, 197-203.
- Sanchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Langa, C. y Bernabeu, C. (2002). Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the

hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* **277**, 43799-43808.

**Sandlund, J., Hedberg, Y., Bergh, A., Grankvist, K., Ljungberg, B. y Rasmuson, T.** (2006). Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int* **97**, 706-710.

**Santibanez, J. F., Blanco, F. J., Garrido-Martin, E. M., Sanz-Rodriguez, F., del Pozo, M. A. y Bernabeu, C.** (2008). Caveolin-1 interacts and cooperates with the transforming growth factor-beta type I receptor ALK1 in endothelial caveolae. *Cardiovasc Res* **77**, 791-799.

**Santibanez, J. F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C. P., Lopez-Novoa, J. M., Attisano, L. y Bernabeu, C.** (2007). Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* **210**, 456-468.

**Sanz-Rodriguez, F., Guerrero-Esteo, M., Botella, L. M., Banville, D., Vary, C. P. y Bernabeu, 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.

**Saura, M., Zaragoza, C., Herranz, B., Grier, M., Diez-Marques, L., Rodriguez-Puyol, D. y Rodriguez-Puyol, M.** (2005). Nitric oxide regulates transforming growth factor-beta signaling in endothelial cells. *Circ Res* **97**, 1115-1123.

**Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q., Pukac, L., Lowik, C. W. y ten Dijke, P.** (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* **120**, 964-972.

**Schnerer, O., Meurer, S. K., Tihaa, L., Gressner, A. M. y Weiskirchen, R.** (2007). Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J Biol Chem* **282**, 13934-13943.

**Schmidt-Weber, C. B., Letarte, M., Kunzmann, S., Ruckert, B., Bernabeu, C. y Blaser, K.** (2005). TGF- $\beta$  signaling of human T cells is modulated by the ancillary TGF- $\beta$  receptor endoglin. *Int Immunol* **17**, 921-930.

**Seki, T., Yun, J. y Oh, S. P.** (2003). Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res* **93**, 682-689.

**Serra, R. y Moses, H. L.** (1996). Tumor suppressor genes in the TGF-beta signaling pathway? *Nat Med* **2**, 390-391.

**Shi, Y. y Massague, J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.

**Shovlin, C. L., Guttmacher, A. E., Buscarini, E., Faughnan, M. E., Hyland, R. H., Westermann, C. J., Kjeldsen, A. D. y Plauchu, H.** (2000). Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* **91**, 66-67.

**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.

**Sibai, B., Dekker, G. y Kupferminc, M.** (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* **365**, 785-799.

**Singer, A. J. y Clark, R. A.** (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* **341**, 738-746.

**Song, G., Ouyang, G. y Bao, S.** (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**, 59-71.

**Sporn, M. B. y Roberts, A. B.** (1992). Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* **119**, 1017-1021.

**St-Jacques, S., Cymerman, U., Pece, N. y Letarte, M.** (1994a). 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.

**St-Jacques, S., Forte, M., Lye, S. J. y Letarte, M.** (1994b). Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* **51**, 405-413.

**Strutz, F., Zeisberg, M., Renziehausen, A., Raschke, B., Becker, V., van Kooten, C. y Muller, G.** (2001). TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* **59**, 579-592.

**Sweet, K., Willis, J., Zhou, X. P., Gallione, C., Sawada, T., Alhopuro, P., Khoo, S. K., Patocs, A., Martin, C., Bridgeman, S. et al.** (2005). Molecular classification of patients with unexplained hamartomatous and hyperplastic polyposis. *Jama* **294**, 2465-2473.

**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.

- Takahashi, N., Kawanishi-Tabata, R., Haba, A., Tabata, M., Haruta, Y., Tsai, H. y Seon, B. K.** (2001). Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* **7**, 524-532.
- Tanaka, F., Otake, Y., Yanagihara, K., Kawano, Y., Miyahara, R., Li, M., Yamada, T., Hanaoka, N., Inui, K. y Wada, H.** (2001). Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res* **7**, 3410-3415.
- ten Dijke, P., Goumans, M. J. y Pardali, E.** (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* **11**, 79-89.
- ten Dijke, P. y Hill, C. S.** (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* **29**, 265-273.
- Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M. G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D. H., Husain, M. y Letarte, M.** (2005). A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* **96**, 684-692.
- Tyner, A. L. y Fuchs, E.** (1986). Evidence for posttranscriptional regulation of the keratins expressed during hyperproliferation and malignant transformation in human epidermis. *J Cell Biol* **103**, 1945-1955.
- 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.
- Velasco-Loyden, G., Arribas, J. y Lopez-Casillas, F.** (2004). The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem* **279**, 7721-7733.
- Velasco, S., Alvarez-Munoz, P., Pericacho, M., Dijke, P. T., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. M. y Rodriguez-Barbero, A.** (2008). L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci* **121**, 913-919.
- Vempati, U. D. y Kondaiah, P.** (1998). Molecular organization of the gene encoding *Xenopus laevis* transforming growth factor-beta 5. *Biochem Mol Biol Int* **45**, 997-1003.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K. H., Yuan, H. T., Libermann, T. A. et al.** (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* **12**, 642-649.
- Vivanco, I. y Sawyers, C. L.** (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 489-501.

- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. y Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**, 5241-5248.
- 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.
- Warrington, K., Hillarby, M. C., Li, C., Letarte, M. y Kumar, S. (2005). Functional role of CD105 in TGF-beta1 signalling in murine and human endothelial cells. *Anticancer Res* **25**, 1851-1864.
- Watanabe, M. y Whitman, M. (1999). The role of transcription factors involved in TGFbeta superfamily signaling during development. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**, 537-543.
- Werner, S. y Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* **83**, 835-870.
- West, K. A., Castillo, S. S. y Dennis, P. A. (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* **5**, 234-248.
- Westphal, J. R., Willems, H. W., Schalkwijk, C. J., Ruiter, D. J. y de Waal, R. M. (1993). A new 180-kDa dermal endothelial cell activation antigen: in vitro and in situ characteristics. *J Invest Dermatol* **100**, 27-34.
- Wiercinska, E., Wickert, L., Denecke, B., Said, H. M., Hamzavi, J., Gressner, A. M., Thorikay, M., ten Dijke, P., Mertens, P. R., Breitkopf, K. *et al.* (2006). Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* **43**, 1032-1041.
- Yamashita, H., Ichijo, H., Grimsby, S., Moren, A., ten Dijke, P. y Miyazono, K. (1994a). Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **269**, 1995-2001.
- Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzen, P., Miyazono, K. y Heldin, C. H. (1994b). Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **269**, 20172-20178.
- Yang, L. Y., Lu, W. Q., Huang, G. W. y Wang, W. (2006). Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **6**, 110.
- Yue, J. y Mulder, K. M. (2000). Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a smad-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**, 35656.
- 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.

**Zhang, Y. E.** (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* **19**, 128-139.

**Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L. y Thomsen, G. H.** (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**, 687-693.