

Tesis Doctoral

Mecanismos de acción de eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada en la funcionalidad de células endoteliales

Maltaneri, Romina Eugenia

2018-03-16

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Maltaneri, Romina Eugenia. (2018-03-16). Mecanismos de acción de eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada en la funcionalidad de células endoteliales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Maltaneri, Romina Eugenia. "Mecanismos de acción de eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada en la funcionalidad de células endoteliales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018-03-16.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**“Mecanismos de acción de eritropoyetina y
eritropoyetina carbamilada en la funcionalidad de
células endoteliales”**

*Tesis presentada para optar al título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica*

Autora: Lic. Romina Eugenia Maltaneri

Directora: Dra. Alcira Nesse

Directora Asistente: Dra. Daniela Vittori

Consejera de Estudios: Dra. Irene Quintana

Laboratorio de Fisiología Celular de la Eritropoyetina
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2018.

Agradecimientos



A mis padres, Nora y Mario, por amarme y apoyarme siempre en todo, porque siempre fueron mi mejor ejemplo, y por todo su esfuerzo y sacrificio.

A mi directora, la Dra. Alcira Nesse, por guiarme y ayudarme a lo largo de esta Tesis, y por su entusiasmo para discutir cada pequeño resultado y cada idea.

A mi codirectora, la Dra. Daniela Vittori, quien me ayudó a dar mis primeros pasos en el trabajo de laboratorio.

A Maru, a quien conozco desde que llegué al labo, y a Agus, con quien parece que nos conociéramos desde hace mucho, por ayudarme, por darme ánimo, y por alegrar cada jornada con su amistad y su compañía.

A Dai y a todas las chicas que fueron parte de este labo, porque todas me enseñaron algo, y me dejaron recuerdos de momentos muy lindos.

A las “vecinas” del labo: Irene, Ana María, Valeria, Silvana, Julia y Lucía, así como también a las muchas personas que integran el Departamento de Química Biológica y que en estos años no sólo me ayudaron desde lo académico, sino que además han sabido darme buenos consejos y palabras de aliento.

A mis amigos, compañeros, profesores y alumnos, y a todas las personas que he conocido en estos años y se han interesado por el devenir de esta Tesis, por escucharme, por sufrir y alegrarse conmigo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a la Universidad de Buenos Aires, de las cuales me siento orgullosamente parte; y con ellas, a la educación pública argentina.

¡Gracias a todos de corazón!

Mecanismos de acción de eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada en la funcionalidad de células endoteliales

Durante mucho tiempo la Eritropoyetina (Epo) fue conocida únicamente por su acción sobre el sistema hematopoyético. Más recientemente, investigaciones desarrolladas para comprender los mecanismos básicos de sus efectos biológicos han revelado un efecto pleiotrópico de Epo que se extiende más allá de la regulación eritropoyética. En este sentido, su capacidad citoprotectora sugiere un posible uso terapéutico en enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, además de su administración a pacientes anémicos.

Por otro lado, la actividad de Epo sobre progenitores eritroides de médula ósea ha sido asociada a una mayor incidencia de eventos trombóticos e hipertensión en pacientes, lo cual ha dado origen a la búsqueda de compuestos derivados incapaces de estimular la eritropoyesis que conserven su actividad citoprotectora. Uno de estos compuestos es la eritropoyetina modificada por carbamilación (cEpo), cuyos efectos sobre el endotelio no han sido estudiados en profundidad hasta el momento.

Con el fin de optimizar el uso clínico de Epo se requiere de un mayor conocimiento para aclarar la compleja interrelación de las acciones hematopoyética y no-hematopoyética de esta citoquina sobre distintos tejidos. En base a esto, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral es aportar nuevos datos sobre los efectos y mecanismos de acción de Epo sobre el endotelio, con particular interés en la angiogénesis, al mismo tiempo que se busca dilucidar si la carbamilación de la molécula de Epo introduce algún cambio en su actividad biológica sobre células endoteliales.

Mediante técnicas de migración por *wound healing*, formación de túbulos de células endoteliales sobre un sustrato similar matriz extracelular y análisis del ciclo celular, realizados sobre la línea celular endotelial humana EA.hy926, determinamos un efecto inductor de Epo sobre la función angiogénica, que no fue observado con cEpo. En cuanto a los mecanismos de acción involucrados, hemos descrito la participación del receptor EpoR₂ y de la quinasa JAK2, asociados a la acción eritropoyética de Epo, en su efecto inductor de la migración en células endoteliales. Si bien cEpo fue capaz de activar las vías de señalización asociadas a Epo, su ausencia de efecto promigratorio estaría relacionada con un cierre prematuro de su señal, mediado por la fosfatasa PTP1B. Este mecanismo de acción diferencial entre ambas eritropoyetinas fue reportado en trabajos anteriores de nuestro grupo realizados en células eritroides.

Por otro lado, nuestros resultados muestran un efecto dual de Epo sobre la generación de especies reactivas de oxígeno, siendo capaz de prevenirla a tiempos largos de exposición, al igual

que cEpo, pero también estimulándola en forma transiente, lo cual constituiría un mecanismo promigratorio. La enzima óxido nítrico sintasa también estaría relacionada con la acción de Epo sobre la migración de células EA.hy926.

La relación entre calcio y eritropoyetina, descrita anteriormente en la diferenciación eritroide, también es importante en la migración de células endoteliales, como lo confirman ensayos realizados con quelantes de este catión. Mediante experimentos realizados con inhibidores farmacológicos de canales de calcio dependientes de voltaje se determinó la participación de los mismos en el influjo de este catión estimulado por Epo, lo que constituye una evidencia a favor de la expresión de estos canales en células endoteliales. El estudio de estos canales nos permitió, además, conocer la actividad antiangiogénica de la amlodipina, un antagonista de calcio de uso clínico como antihipertensivo. Por otra parte, también se determinó la importancia de canales de calcio TRPC y canales de potasio en la respuesta migratoria a Epo. El calcio fue también un intermediario en el efecto inductor de Epo sobre la expresión de acuaporina-1, cuya función como proteína canal de agua hemos visto por primera vez asociada a la migración estimulada por Epo.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de Tesis muestran un efecto diferencial de eritropoyetina y su derivado carbamilado sobre la angiogénesis, mediante mecanismos similares a los observados en células eritroides, y aportan información sobre los diferentes intermediarios y efectores de Epo en su modulación de la actividad angiogénica. La incapacidad de cEpo de activar procesos relacionados a la migración celular genera interés en su posible aplicación terapéutica, ya que podría ejercer citoprotección sin estimular la angiogénesis ni la eritropoyesis en pacientes donde estos procesos pueden representar un efecto indeseado.

Palabras claves: Eritropoyetina – Eritropoyetina carbamilada – Células endoteliales – Angiogénesis – Migración celular – Calcio – Acuaporina-1

Action mechanisms of erythropoietin and carbamylated erythropoietin in endothelial cell function

For a long time, erythropoietin (Epo) was only recognized for its actions in the hematopoietic system. More recently, research aimed at understanding the basic mechanisms of its biological effect has revealed a pleiotropic cytoprotective activity of Epo beyond the regulation of erythropoiesis. These findings have placed Epo as a compound of therapeutical interest in neurodegenerative and cardiovascular ailments, apart from the treatment of anemia.

On the other hand, the activity of Epo on bone marrow erythroid progenitors has been associated to a greater incidence of thrombotic events and hypertension in patients, which has prompted researchers to find derivatives of Epo incapable of erythropoiesis but with a cytoprotective action. One such compound is carbamylated erythropoietin (cEpo), the effects of which are still largely unknown in endothelial cells.

With the aim of optimizing the clinical use of Epo, further knowledge is required to clarify the complex relationship between the hematopoietic and the non-hematopoietic actions of this cytokine in different tissues. Stemming from this, one of the purposes of this Thesis has been to provide further information on the effects and action mechanisms of Epo in endothelial cells, with particular interest in the angiogenic function, as well as to determine if carbamylation of the Epo molecule could introduce modifications in its biological activity in this cell type.

The use of different techniques to study the many aspects of angiogenesis, such as cell migration through wound healing assays, cell cycle analysis and tube formation on an extracellular-matrix-like substrate, allowed us to detect a stimulatory effect of Epo on the EA.hy926 endothelial cell line, which was not matched by cEpo. Among the underlying mechanisms, we have described the participation of the EpoR₂ receptor and of JAK2 kinase, both associated to the erythropoietic action of Epo, in the promigratory effect of this cytokine. Although cEpo was able to activate the same signalling pathways of Epo, its lack of effect on cell migration could be related to a premature termination of its signal, mediated by the phosphatase PTP1B. This mechanism was also reported in previous works performed by our group on erythroid cells.

Our results further show a dual effect of Epo on the generation of reactive oxygen species, being capable of preventing it at long incubation times, but with a transient stimulating effect at shorter exposures, which could represent a promigratory mechanism. The endothelial nitric oxide synthase may also be related to the action of Epo on endothelial cell migration.

The relationship between calcium and Epo, previously described in erythroid differentiation, also plays a key role on endothelial cell migration, as confirmed in experiments performed with

calcium chelating agents. Assays carried out with pharmacological inhibitors of voltage-dependent calcium channels allowed us to determine the involvement of this type of channels in Epo-induced calcium influx, thus supporting their much-debated expression in endothelial cells. The study of these channels allowed us to test the antiangiogenic properties of amlodipine, a calcium antagonist used in the clinic as an antihypertensive compound. On the other hand, we have also determined the participation of TRPC calcium channels and potassium channels in the migratory response to Epo. In addition, we reported for the first time the ability of Epo to increase the expression of aquaporin-1, a water channel involved in the promigratory activity of the cytokine, and the role of calcium as a mediator of such effect.

Taken together, the results presented in this Thesis show a differential effect of erythropoietin and its carbamylated derivative on angiogenesis, through action mechanisms similar to those reported in erythroid cells. This work also provides information regarding different mediators and effectors of Epo in endothelial cells. The incapacity of cEpo to activate processes related to endothelial cell migration hints at possible therapeutical applications, since it could exert cytoprotection without stimulating red blood cell production or angiogenesis.

Key words: Erythropoietin – Carbamylated erythropoietin – Endothelial cells – Angiogenesis – Cell migration – Calcium – Aquaporin-1

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis han sido presentados en reuniones científicas y publicados en revistas científicas con referato.

Publicaciones en revistas científicas con referato

✚ **“Differential effect of erythropoietin and carbamylated erythropoietin on endothelial cell migration.”** MALTANERI, R.; Chamorro, M. E.; Schiappacasse, A.; Nesse, A.; Vittori, D. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017; 85:25–34. doi: 10.1016/j.biocel.2017.01.013.

✚ **“Participation of membrane calcium channels in erythropoietin-induced endothelial cell migration.”** MALTANERI, R.; Schiappacasse, A.; Chamorro, M. E.; Nesse, A.; Vittori, D. Trabajo de investigación enviado para su publicación a la revista *European Journal of Cell Biology*.

Presentaciones en reuniones científicas

✚ **“Effect of the calcium channel blockers amlodipine and diltiazem on erythropoietin-mediated angiogenesis.”** MALTANERI, R.; Schiappacasse, A.; Chamorro, M. E.; Nesse, A.; Vittori, D. Póster presentado en la LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica; Buenos Aires, 13-17 de noviembre de 2017. Resumen publicado en *Medicina (Buenos Aires)*, Vol. 77 Supl. I: 130-131; 2017.

✚ **“Calcio como mediador del efecto de eritropoyetina en la migración de células endoteliales.”** MALTANERI, R.; Schiappacasse, A.; Chamorro, M.; Nesse, A.; Vittori, D. Póster presentado en las Jornadas del Departamento de Química Biológica de la FCEyN; Buenos Aires, 5 y 6 de diciembre de 2017.

✚ **“Erythropoietin-induced endothelial cell migration relies on an intracellular calcium increase.”** MALTANERI, R.; Chamorro, M.; Schiappacasse, A.; Nesse, A.; Vittori, D. Póster presentado en la LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica; Mar del Plata, 16-19 de noviembre de 2016. Resumen publicado en *Medicina (Buenos Aires)*, Vol. 75 Supl. II: 84; 2016. Este trabajo fue reconocido con el **Premio al Mejor Póster de la sesión de Hematología**.

✚ **“Eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada en la migración endotelial.”** MALTANERI, R.; Schiappacasse, A.; Chamorro, M.; Nesse, A.; Vittori, D. Póster presentado en la LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica; Mar del Plata, 18-21 de noviembre de 2015. Resumen publicado en *Medicina (Buenos Aires)*, Vol. 75 Supl. II: 84; 2015. Este trabajo fue reconocido con el **Premio al Mejor Póster de la sesión de Hematología**.

✚ **“Participación de aquaporina-1 en la migración endotelial inducida por eritropoyetina.”** MALTANERI, R.; Chamorro, M.; González, Guadalupe; Nesse, A.; Vittori, D. Póster presentado en la LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica; Mar del Plata, 19-22 de noviembre de 2014. Resumen publicado en *Medicina (Buenos Aires)*; Vol. 74 (Supl. III): 267; 2014.

✚ **“Efectos de eritropoyetina y su derivado carbamilado sobre células endoteliales.”** MALTANERI, R.; Chamorro, M.; Nesse, A.; Vittori, D. Póster presentado en la LVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, 16-19 de noviembre de 2013. Resumen publicado en *Medicina (Buenos Aires)*; Vol. 73 (Supl. III): 201; 2013.

AG490	tirfostina, inhibidor de JAK2
Aml	amlodipina
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , análisis de la varianza
ADNc	ADN complementario
ARNm	ARN mensajero
Asc	ácido ascórbico
AQP-1	acuaporina-1
BAEC	<i>Bovine Artery Endothelial Cells</i> , células endoteliales de aorta bovina
βCR	receptor β-common (CD131)
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i> , factor de crecimiento de fibroblastos (básico)
BPW	<i>buffer PermWash</i> (BD)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albúmina sérica bovina
Ca²⁺	calcio iónico libre
Calp	calpeptina, inhibidor sintético de calpaína
cEpo	eritropoyetina carbamilada
Cinn	CinnGel 2Me, inhibidor de PTP1B
DCFH-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato, sonda de ROS
DEPC	dietilpirocarbonato
Dil	diltiazem
DMEM	<i>Dulbecco's Minimum Essential Medium</i> , medio de cultivo
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfatados
ECZ	electroforesis capilar de zona
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético, quelante de calcio
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético, quelante de calcio
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i> , óxido nítrico sintasa endotelial
Epo	eritropoyetina
EpoR	receptor de Epo (monomérico)
FITC	isotiocianato de fluoresceína, fluoróforo
Fluo 4-AM	sonda fluorescente que detecta calcio intracelular
GAPDH	gliceraldehído-6-P-deshidrogenasa
GM-CSF	<i>Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor</i> , factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
Hg²⁺	ión mercurio
HMEC-1	<i>Human Microvascular Endothelial Cells-1</i> , células endoteliales de microvasculatura humana
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , peroxidasa de rabanito
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> , células endoteliales de vena umbilical humana
ICa	ionóforo de calcio
ICAM-1	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule-1</i> , molécula de adhesión intercelular-1
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i> , factor de crecimiento similar a insulina
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> , medio de cultivo
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
K⁺	ión potasio

L-NMMA	L-NG-monometilarginina, inhibidor de NOS
LY249002	inhibidor de PI3K
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> , medio de cultivo
MTT	bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NO	óxido nítrico
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> , óxido nítrico sintasa
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> , buffer fosfato salino
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> , factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	paraformaldehído
PI3K	<i>Phosphatidil Inositol 3 Kinase</i> , fosfatidil inositol 3 kinasa
PTP1B	<i>Protein Tyrosin Phosphatase 1 B</i> , proteína tirosina fosfatasa 1 B
Qui	quinina
rHuEpo	eritropoyetina recombinante humana
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , especies reactivas del oxígeno
SCF	<i>Stem Cell Factor</i> , factor de células madre
SDS	<i>Sodium Dodecylsulphate</i> , dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	SDS - <i>Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i> , electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , error estándar de la media
SFB	suero fetal bovino
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , pequeño ARN interferente
STP	staurosporina
TAE	<i>buffer</i> Tris-Acético-EDTA
Taq	enzima polimerasa obtenida de <i>Thermophilus aquaticus</i>
polimerasa	
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i> , buffer Tris salino
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> , factor de necrosis tumoral- α
TNFR1	receptor 1 de TNF- α
TRPC	<i>Transient Potential Calcium Channels</i> , canales de calcio de potencial transiente
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> , molécula de adhesión celular vascular-1
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , factor de crecimiento del endotelio vascular

Introducción	1 - 24
I. Eritropoyetina: estructura, función y aspectos clínicos	1
Estructura de la eritropoyetina	1
Importancia funcional de las glicosilaciones	2
Sitios de expresión de la eritropoyetina	3
Regulación de la expresión de la eritropoyetina	4
Receptores y vías de señalización activadas por la eritropoyetina	5
Receptor de eritropoyetina	5
Vías de señalización activadas por la eritropoyetina	7
<i>PI3K, PKB y AKT</i>	7
<i>MAPKs</i>	8
<i>Factores de transcripción STAT</i>	9
Terminación de la señal desencadenada por eritropoyetina	9
Actividad biológica de la eritropoyetina	10
En células eritroides	10
En otros tejidos	10
Eritropoyetina en la clínica	11
II. Compuestos derivados de la Epo	12
Agentes estimulantes de la eritropoyesis	13
Derivados no eritropoyéticos de la eritropoyetina	13
Eritropoyetina carbamilada (cEpo)	13
III. El endotelio vascular: estructura, función e importancia fisiopatológica	15
Células endoteliales y eritroides: un origen común	15
Heterogeneidad del endotelio	16
Funciones del endotelio	17
Angiogénesis	18
Etapas de la migración celular	19
Intermediarios y efectores de la migración celular	20
<i>Calcio</i>	20
<i>Especies reactivas de oxígeno</i>	20
<i>Óxido nítrico</i>	21
<i>Acuaporina-1</i>	21
Objetivos	25-26
Hipótesis de trabajo	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Materiales y Métodos	27-52

I. Equipos, software y reactivos	27
I.1 Equipos	27
I.2 <i>Software</i>	27
I.3 Reactivos y anticuerpos	27
I.4 Calidad del agua	29
I.5 Esterilización de materiales y soluciones	29
I.6 Higiene y seguridad en el manejo de residuos peligrosos y patogénicos	29
II. Cultivos celulares	30
II.1 Células endoteliales	30
<i>Células HUVEC</i>	30
<i>Células EA.hy926</i>	30
<i>Células HMEC-1</i>	31
Reproducción del estado de quiescencia en células endoteliales	32
II.2 Células no endoteliales	32
<i>Células UT-7</i>	32
<i>Células SH-SY5Y</i>	32
II.3 Disociación de células adherentes y subcultivo	32
II.4 Criopreservación de líneas celulares	33
II.4.1 Congelamiento de células	33
II.4.2 Descongelamiento de células	33
III. Protocolos	34
III.1 Estudio de proliferación, viabilidad y ciclo celular	34
III.1.1 Proliferación y viabilidad de células EA.hy926 por recuento en cámara de Neubauer con azul Tripán	34
III.1.2 Ciclo celular por citometría de flujo	34
III.2 Ensayos de migración y angiogénesis	35
III.2.1 Ensayo de <i>wound healing</i>	35
III.2.2 Ensayo de formación de túbulos sobre sustrato símil matriz extracelular	35
III.3 Inhibidores empleados	37
III.4 Electroforesis y <i>Western blotting</i>	38
III.4.1 Extracción de proteínas	38
III.4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE) y desnaturalizantes (SDS-PAGE).	38
III.4.3 Electrotransferencia de proteínas	39
III.4.4 <i>Western blotting</i>	40
III.5 Cuantificación de los niveles de ARN mensajero	40
III.5.1 Extracción y purificación de ARN total	40
III.5.2 Pasaje a ADNc	41
III.5.3 Amplificación del ADNc de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	41

<i>RT-PCR de punto final (endpoint RT-PCR)</i>	41
<i>Electroforesis en gel de agarosa y revelado</i>	42
<i>RT-PCR en tiempo real (real-time PCR) de AQP1</i>	42
III.6 Silenciamiento de AQP-1 y de EpoR mediante interferencia por RNA	43
III.7 Citometría de flujo	46
III.7.1 Determinación de antígeno internos y antígenos de membrana con epítipo interno	46
III.7.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	46
III.7.3 Determinación de calcio intracelular	47
III.8 Microscopía de fluorescencia y confocal	47
III.8.1 Inmunomarcación de AQP-1	47
III.8.2 Marcación nuclear por tinción con Hoechst 33258	48
III.8.3 Marcación de actina filamentosa con faloidina-TRITC	48
III.9 Preparación y caracterización de cEpo	48
III.9.1 Caracterización química de cEpo	49
<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE nativo)</i>	49
<i>Electroforesis capilar de zona (ECZ)</i>	49
III.9.2 Caracterización funcional de cEpo	50
<i>Estudio de la capacidad eritropoyética de Epo y cEpo</i>	50
<i>Ensayo de protección frente a apoptosis inducida por staurosporina en células de neuroblastoma SH-SY5Y</i>	51
III.10 Análisis estadístico	52
Resultados y discusión	53-128
Capítulo I. Estudio comparativo de la capacidad angiogénica de eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada	53
I.1 Proliferación celular	53
I.1.1 Recuento en cámara de Neubauer	53
I.1.2 Estudio del ciclo celular	54
I.2 Migración y tubulogénesis	56
I.2.1 Ensayos de cierre de la herida (<i>wound healing</i>)	56
I.2.2 Formación de túbulos de células endoteliales	59
I.2.3 Modificaciones en el citoesqueleto	59
I.3 Conclusiones	62
Discusión Capítulo I	63
Capítulo II. Receptores y mecanismos de acción de eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada en células endoteliales	65
II.1 Expresión de receptores	65
II.2 Receptores y vías de señalización involucradas en el efecto de Epo	67
II.2.1 Participación de EpoR y β cR y las vías de transducción asociadas	67

II.2.2 Funcionalidad del receptor β cR	68
II.2.3 Ensayos de competencia entre cEpo y Epo	69
II.2.4 Ensayos de competencia entre Epo y VEGF	71
II.2.5 Fosforilación de JAK2	72
II.2.6 Fosforilación de AKT	72
II.3 Participación de PTP1B en el efecto diferencial de Epo y cEpo sobre la migración de células endoteliales	73
II.3.1 PTP1B en la ausencia de efecto proangiogénico de cEpo	74
II.3.2 Efecto de Epo y cEpo sobre los niveles de expresión de PTP1B	75
II.4 Conclusiones	75
Discusión Capítulo II	77
Capítulo III. Citoprotección y migración de células endoteliales por eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada. Participación de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico.	80
III.1 Efecto citoprotector de Epo y cEpo en condiciones prooxidantes	80
III.1.1 Experimentos preliminares en células HUVEC	80
III.1.2 Experimentos en células EA.hy926	83
<i>Acción de Epo y cEpo en un ambiente prooxidante generado por privación de SFB</i>	83
<i>Acción de Epo y cEpo en un ambiente prooxidante generado por peróxido de hidrógeno</i>	84
III.2 Participación de especies reactivas de oxígeno en el efecto promigratorio de Epo	85
III.2.1 Ensayos de migración en presencia de compuestos antioxidantes	85
III.2.1 Generación de ROS por Epo y cEpo	86
III.3 Participación de óxido nítrico en el efecto promigratorio de Epo	87
III.4 Conclusiones	88
Discusión Capítulo III	90
Capítulo IV. Participación de calcio y canales iónicos en la migración de células endoteliales inducida por eritropoyetina	93
IV.1 Participación del calcio en la migración celular	93
IV.2 Efecto de Epo y cEpo sobre el calcio intracelular	95
IV.3 Canales de calcio involucrados en el efecto proangiogénico de Epo	95
IV.3.1 Actividad de canales de calcio en células endoteliales en respuesta a Epo	96
IV.3.2 Participación de canales de calcio en la angiogénesis inducida por Epo.	97
IV.3.2.a <i>Canales de tipo TRPC</i>	97
IV.3.2.b <i>Participación de canales de potasio</i>	99
IV.3.2.c <i>Canales dependientes de voltaje</i>	100
<i>Migración celular en presencia de antagonistas de calcio de uso clínico</i>	100
<i>Tubulogénesis en presencia de antagonistas de calcio de uso clínico</i>	102

IV.3.3 Mecanismos de acción diferencial de amlodipina y diltiazem: generación de ROS.	104
IV.4 Migración endotelial inducida por Epo en un ambiente proinflamatorio	106
IV.4.1 Inducción de la migración de células endoteliales por TNF- α	106
IV.4.2 Efecto conjunto de TNF- α y Epo sobre la migración endotelial	107
IV.4.3 Efecto de TNF- α y Epo sobre la expresión de receptores	109
IV.5 Conclusiones	111
Discusión Capítulo IV	113
Capítulo V. Participación de acuaporina-1 en la migración de células endoteliales inducida por eritropoyetina	117
V.1 Expresión de AQP-1 en células endoteliales	117
V.2 Participación de AQP-1 en la migración endotelial inducida por SFB y por Epo	118
V.2.1 Inhibición de acuaporinas por Hg ²⁺	119
V.2.2 Inhibición de AQP-1 por siRNA específico	121
V.3 Modulación de la expresión de AQP-1 por Epo	122
V.3.1 Inducción de AQP-1 por Epo	122
V.3.2 Participación de calcio en la inducción de AQP-1 por Epo	124
V.3.3 Participación de NO en la inducción de AQP-1 por Epo	124
V.4 Conclusiones	125
Discusión Capítulo V	126
Consideraciones finales	129-131
Referencias	132-142

Introducción

I. Eritropoyetina: estructura, función y aspectos clínicos

Conocida desde principios del siglo XX con el nombre de *hemopoyetina*, la eritropoyetina (Epo) es hoy considerada el principal factor de crecimiento y diferenciación de células eritroides.

La existencia de un factor humoral responsable de la producción de glóbulos rojos fue sugerida por primera vez en 1906 por Carnot y Deflandre, tras constatar un incremento en el número de eritrocitos en conejos sanos transfundidos con sangre de conejos anémicos. Bonsdorff y Jalavisto (1948) denominaron a este factor *eritropoyetina*, tras realizar un experimento similar en el que transfundían sangre de animales hipóxicos a animales sanos, con el consecuente incremento en el recuento de glóbulos rojos.

Epo fue purificada a partir de la orina de pacientes anémicos en 1977 (Miyake et al.) y su gen fue clonado ocho años más tarde (Jacobs et al., 1985). Estos descubrimientos permitieron la manufactura industrial de Epo recombinante humana (rHuEpo) para su utilización terapéutica en pacientes anémicos. En los últimos años, un número creciente de trabajos de investigación han despertado el interés en Epo debido a su posible actividad protectora en tejidos no hematopoyéticos.

Estructura de la eritropoyetina

La eritropoyetina humana es una citoquina codificada por el gen *EPO*, situado en el brazo largo (q) del cromosoma 7 (7q11-22). Su transcripción da lugar a un ARNm consistente de cinco exones y cuatro intrones, que no sufre *splicing* alternativo. La traducción del ARNm da origen a un polipéptido de 193 aminoácidos, que es posteriormente glicosilado y clivado por enzimas citoplasmáticas.

El péptido es *N*-glicosilado en Asn24, Asn38 y Asn 83 y *O*-glicosilado en Ser126 (**Figura A**), además de sufrir la remoción de una secuencia secretoria de 27 aminoácidos hidrofóbicos. La Arg 166 de su extremo carboxilo terminal es clivada antes de su paso a circulación, con lo cual la estructura primaria de la eritropoyetina madura presenta 165 aminoácidos y cuenta con dos puentes disulfuro entre Cys29-Cys33 y Cys7-Cys161 (Wang et al., 1985). La masa molecular de la cadena polipeptídica se estima en 18 kDa, y asciende a 34 kDa considerando las glicosilaciones.

Mediante la técnica de dicroísmo circular se determinó que la estructura secundaria de la Epo presenta un 50% de α -hélices, de modo que dos pares de hélices se disponen antiparalelas (**Figura B**), como se observa en la estructura secundaria de la hormona de crecimiento.

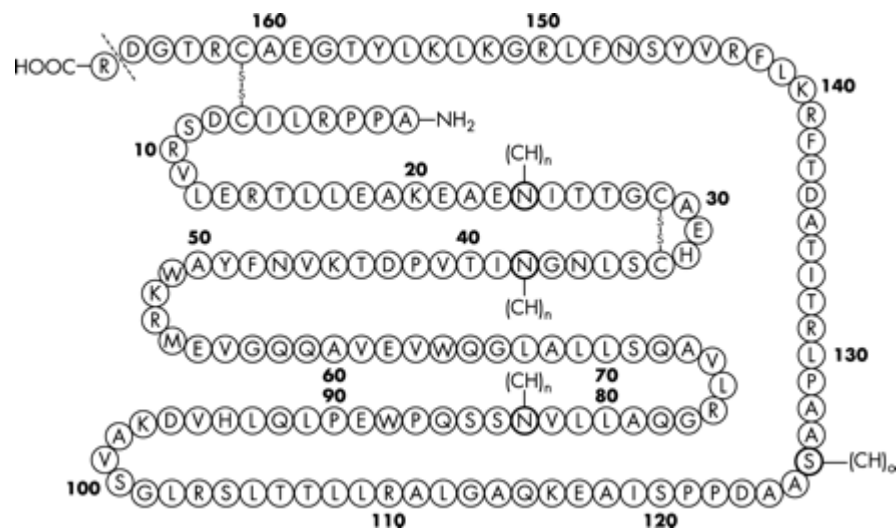


Figura A. Estructura primaria de la eritropoyetina humana. (CH)_n denota *N*-glicosilación en los residuos Asp24, Asp38 y Asp83, mientras que (CH)_o representa *O*-glicosilación en Ser126. La Arg166 es clivada antes de la secreción al torrente sanguíneo. Imagen obtenida de Ng et al. (2003).

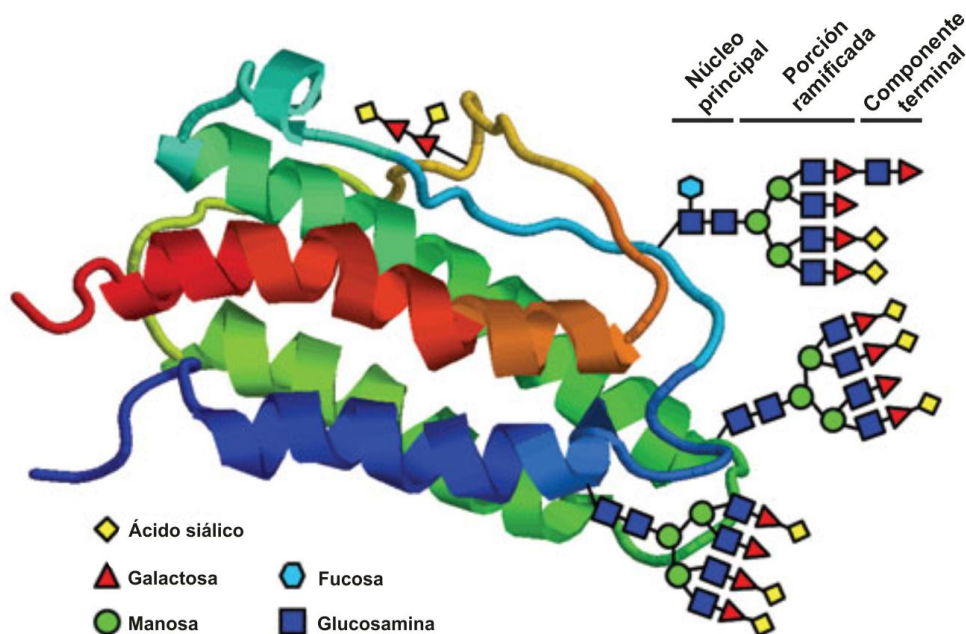


Figura B. Estructura secundaria de la eritropoyetina humana. Se observan las cuatro α -hélices que la componen y las cuatro glicosilaciones añadidas postraduccionalmente. Las modificaciones más ramificadas y voluminosas de la derecha corresponden a los tres sitios de *N*-glicosilación en los residuos Asp24, Asp38 y Asp83, mientras que la restante representa la *O*-glicosilación en Ser126. El código de formas y colores ejemplifica la composición de las glicosilaciones. Imagen adaptada de Ng et al. (2003).

Importancia funcional de las glicosilaciones

La *N*-glicosilación de una proteína se da por unión de un glicano al grupo amino del aminoácido asparagina, mientras que la *O*-glicosilación consiste en la unión de monosacáridos al hidroxilo de

los aminoácidos serina o treonina. Ambas modificaciones tienen lugar en el retículo endoplasmático.

Si bien aún no se conoce la función de la *O*-glicosilación en Ser126, las *N*-glicosilaciones de Epo cumplen un rol esencial en su actividad biológica, que se reduce a un 10% en la apoproteína. Cada una de las *N*-glicosilaciones de Epo presenta tres unidades funcionales (Ng et al., 2003), esquematizadas en la **Figura B**:

- ✦ El **núcleo principal** está compuesto por glucosaminas, y tiene como función mantener la conformación de la cadena polipeptídica.
- ✦ La **porción ramificada** confiere estabilidad en circulación, y su grado de ramificación correlaciona positivamente con la actividad biológica de Epo *in vivo*.
- ✦ El **componente terminal** consiste en ácido siálico y unidades repetidas de poli-*N*-acetil-galactosamina. Es importante para la unión de Epo a su receptor y correlaciona directamente con la actividad biológica de Epo *in vivo*.

La eritropoyetina recombinante humana (rHuEpo) presenta la misma estructura primaria y el mismo número de sitios de glicosilación que la Epo endógena. Sin embargo, variaciones en el patrón de glicosilación confieren a la molécula diferentes propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.

Sitios de expresión de la eritropoyetina

Si bien durante la etapa fetal la expresión y secreción de Epo es predominantemente hepática, tras el nacimiento el riñón se convierte en el sitio primario de producción de esta citoquina, relegando al hígado a un segundo lugar. Los mecanismos que regulan el *switch* entre expresión hepática y renal aún no se conocen.

Actualmente se acepta que la síntesis renal de Epo es llevada a cabo por células intersticiales de tipo I presentes tanto en la corteza como en la médula. Estas células son semejantes a fibroblastos peritubulares y tienen su origen en la cresta neural (Maxwell et al., 1993). Mediante hibridación *in situ* y uso de animales transgénicos se determinó que, a diferencia del riñón, el hígado posee dos tipos celulares productores de Epo: hepatocitos y células de Ito (Maxwell et al., 1994). Estímulos capaces de aumentar la producción de Epo en hepatocitos incrementan los niveles de expresión a nivel celular, mientras que en los fibroblastos peritubulares renales dicha inducción involucra el reclutamiento de un mayor número de células.

Se estima que alrededor del 10% de la Epo circulante es de origen no renal. Sin embargo, aún se desconoce por qué la citoquina secretada por otros tejidos no es capaz de compensar el déficit de Epo en la enfermedad renal crónica. Se han detectado niveles de expresión de esta citoquina

en bazo, pulmón, testículo y cerebro, sin diferencias estructurales o de actividad biológica entre las Epo provenientes de estos sitios de secreción secundarios y las Epo renal o hepática. En el sistema nervioso, el ARNm de Epo se expresa principalmente en corteza e hipocampo, siendo las neuronas y los astrocitos los tipos celulares secretores. Tanto en cerebro como en testículo, la Epo se encuentra separada de la circulación general mediante la barrera hematoencefálica y hematotesticular, respectivamente, lo que sugiere una acción paracrina no relacionada con la eritropoyesis.

Regulación de la expresión de la eritropoyetina

El gen de Epo presenta en su extremo 3' una secuencia regulatoria denominada elemento de respuesta a hipoxia (HRE, *hypoxia response element*), a la que es capaz de unirse una familia de proteínas conocidas como factor inducible por hipoxia (*hypoxia-inducible factor*, HIF). La expresión de estos HIFs —a los que se considera los reguladores fisiológicos de la Epo— está modulada por la tensión de oxígeno. Estos factores de transcripción son heterodiméricos, formados por una proteína sensible a la tensión de oxígeno (HIF- α) y una subunidad constitutiva (HIF- β). El representante más importante de esta familia de factores de transcripción es el HIF-1.

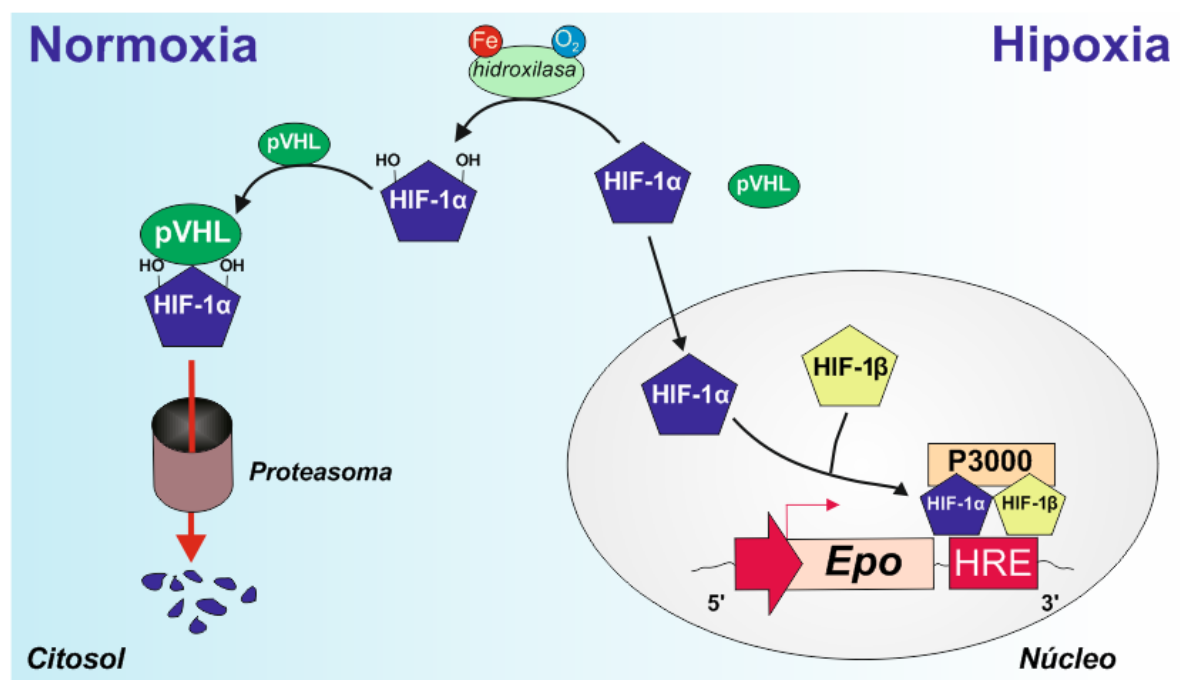


Figura C. Regulación de la expresión de eritropoyetina por el factor de transcripción HIF-1. En normoxia, la subunidad HIF-1 α hidroxilada es marcada para su degradación en proteasoma por las proteínas pVHL y ubiquitina. A menor presión parcial de O₂, HIF-1 α no es degradada y puede traslocarse al núcleo, donde se une a la subunidad HIF-1 β y es reclutada por el factor P300. Este complejo proteico se une a secuencias HRE en el gen de Epo, induciendo su transcripción.

El ARNm de HIF-1 α se expresa en forma constitutiva en normoxia, pero su proteína es rápidamente degradada en proteasoma tras la unión de la proteína von Hippel-Lindau (pVHL) (**Figura C**).

El reclutamiento de esta proteína requiere la hidroxilación de ciertos residuos prolina de HIF-1 α por proteínas dependientes de hierro y oxígeno. En normoxia, estos residuos prolina de HIF-1 α se encuentran hidroxilados, con lo cual la pVHL puede unirse y desencadenar la eliminación de HIF-1 α . En hipoxia, en cambio, la pVHL no puede unirse a HIF-1 α , que se acumula en el núcleo, heterodimeriza con HIF- β y recluta al coactivador p3000, formando un complejo que se une al *enhancer* de Epo y estimula su transcripción (Jelkmann et al., 2004).

Receptores y vías de señalización activadas por la eritropoyetina

Receptor de eritropoyetina

El receptor de Epo pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas, junto a los receptores de hormona de crecimiento, prolactina, trombopoyetina, GM-CSF (factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos) y varias interleuquinas. El receptor EpoR humano es una proteína de 508 aminoácidos, con un peso molecular de 55-56 kDa, que presenta las siguientes características estructurales (Farrell et al., 2004):

- ✦ un **dominio extracelular** de 226 aminoácidos, con dos pares de residuos cisteína conservados y un motivo WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser) conservado, próximo al dominio transmembrana;
- ✦ un único **dominio transmembrana** de 23 aminoácidos;
- ✦ un **dominio intracelular**, de 235 aminoácidos, sin actividad catalítica. Este dominio es rico en prolina y presenta tres segmentos conservados (Box1, Box2 y el segmento entre ambos) implicados en la asociación de EpoR con la quinasa JAK2 (**Figura D**).

La interacción entre EpoR y su ligando ocurre en una región hidrofóbica (que contiene los residuos Phe93, Met150 y Phe205) y constituye su “epitope funcional”. Epo induce la dimerización de dos subunidades EpoR, provocando cambios conformacionales en el dominio extracelular del receptor. Estos cambios posibilitan el acercamiento de las quinasas JAK2 asociadas a cada subunidad y su transfosforilación en Tyr1007, con su consecuente activación (Constantinescu, 1999).

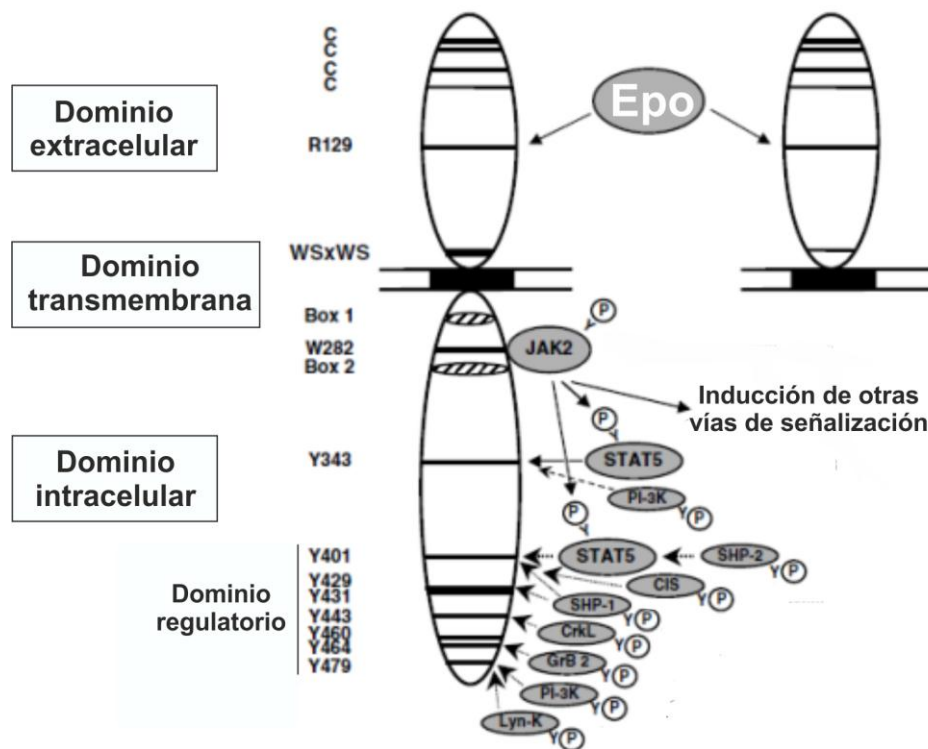


Figura D. Estructura del receptor de eritropoyetina (EpoR). El receptor EpoR presenta diversos segmentos conservados en su región citosólica: box 1 (residuos 257–264), box 2 (residuos 303–313) y la región entre box 1 y 2 (residuos 265–302), implicados en la asociación entre EpoR y JAK2. JAK2 activada fosforila al receptor en ocho tirosinas, enumeradas en la imagen, que sirven como sitio de anclaje a diversas proteínas intracelulares, tales como PI3K y STAT5. Estas proteínas son, a su vez, también fosforiladas por JAK2, lo que desencadena la activación de diferentes vías de señalización. La activación de las fosfatasas SHP (*Src-homology phosphatase*) 1 y 2 representa un mecanismo regulatorio negativo. Imagen adaptada de Dame (2003).

Como hormona, la Epo producida en el riñón circula a una concentración de aproximadamente 5 pM (Elliott y Sinclair, 2012), que puede incrementarse hasta 100 veces en hipoxia crónica severa. En médula ósea, Epo se une al receptor homodimérico EpoR₂ presente en la superficie de los progenitores eritroides con una afinidad de 100-200 pM. A diferencia de la acción endocrina que tiene como resultado la eritropoyesis, la Epo producida en forma local por otros tejidos en situaciones de hipoxia o estrés metabólico alcanza concentraciones más elevadas, a través de las cuales ejerce un efecto citoprotector.

Brines et al. (2004) reportaron que la protección tisular ejercida por Epo es mediada por un receptor que involucra tanto a EpoR como a la subunidad β -common (β cR), integrante de los receptores del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de las interleuquinas 3 y 5 (**Figura E**). Trabajos anteriores habían demostrado una asociación física entre ambas proteínas (Jubinsky et al., 1997) así como también una interacción funcional, dada la capacidad de Epo de estimular la fosforilación de β cR en tirosina y el reclutamiento de STAT5 (Chin et al., 1997).

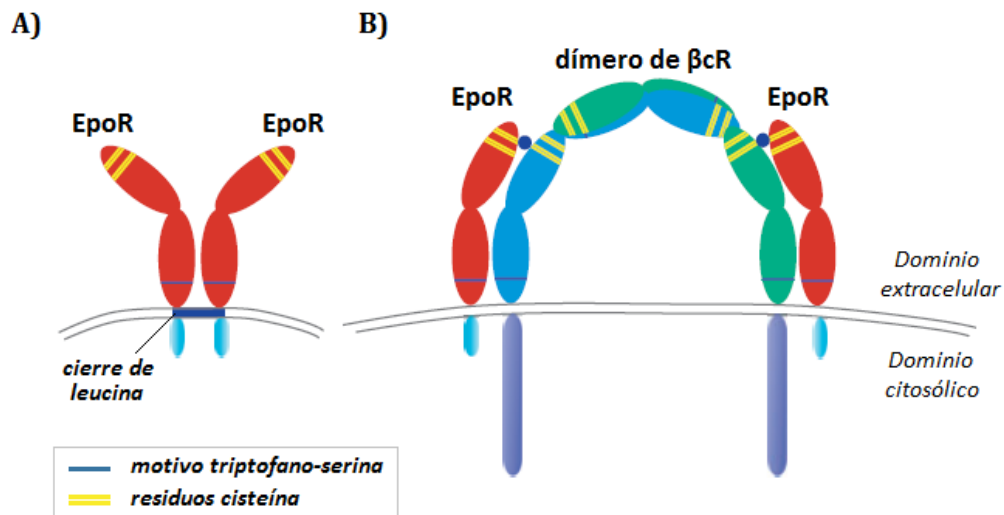


Figura E. Receptor clásico y alternativo de eritropoyetina. Epo ejerce su efecto eritropoyético mediante un receptor homodimérico, constituido por dos subunidades EpoR estabilizadas por un motivo cierre de leucinas **(A)**. La actividad protectora de Epo se encuentra mediada por el heteroreceptor constituido por subunidades EpoR y βcR (CD131). βcR se presenta como un dímero antiparalelo. Sendas subunidades EpoR se asocian con cada βcR mediante unión de cistina **(B)**. Imagen adaptada de Brines y Cerami (2008).

Debido a que la afinidad de Epo por el receptor alternativo es menor (1-20 nM), resulta necesario administrar concentraciones más elevadas de la citoquina para lograr una dosis terapéutica citoprotectora. Estas características farmacológicas reducen la probabilidad de que la Epo renal circulante pueda interactuar con el sistema citoprotector (Brines y Cerami, 2008).

Vías de señalización activadas por eritropoyetina

La unión de Epo a su receptor activa a JAK2, que fosforila ocho residuos tirosina en la región intracelular de cada subunidad EpoR. Estos residuos fosfotirosina sirven de punto de anclaje a diversas proteínas con dominios Src homology-2 (SH2), que desencadenan diferentes vías de señalización **(Figura F)**:

PI3K y AKT

Una de las vías de señalización activadas por Epo es la que involucra a la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y a la quinasa AKT (Chateauvieux et al., 2011). PI3K está constituida por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad regulatoria (p85) que se une directamente a EpoR mediante su tirosina Y479 fosforilada por JAK2. La unión y activación de PI3K da lugar a la fosforilación de AKT, capaz de fosforilar y activar otras proteínas involucradas en la regulación de la eritropoyesis, tales como el factor de transcripción GATA-1. FOXO3A (*Forkhead Box 03A*) es otro factor de transcripción relevante para la eritropoyesis. Su fosforilación por parte de AKT inhibe su actividad transcripcional, lo que impide, a su vez, la expresión de elementos represores de la proliferación, tales como la proteína inhibidora del ciclo celular p27^{kip1}, y la quinasa

dependiente de ciclinas CDK (Kashii et al., 2000; Lei et al., 2009). Otros genes regulados por FOXO3A son las proteínas proapoptóticas BIM (de la familia de Bcl-2), y TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) (Spivak, 2005).

MAPKs

A través de la proteína adaptadora Grb2, Epo es capaz de activar la señalización mediada por Ras y Raf, resultante en la estimulación de la vía de las MAP quinasas. Raf1 está implicada en la proliferación celular y presenta actividad antiapoptótica, ya que inhibe caspasa-3. La estimulación de la eritropoyesis por Epo requiere de la modulación de MAPKs (Nagata et al., 1998).

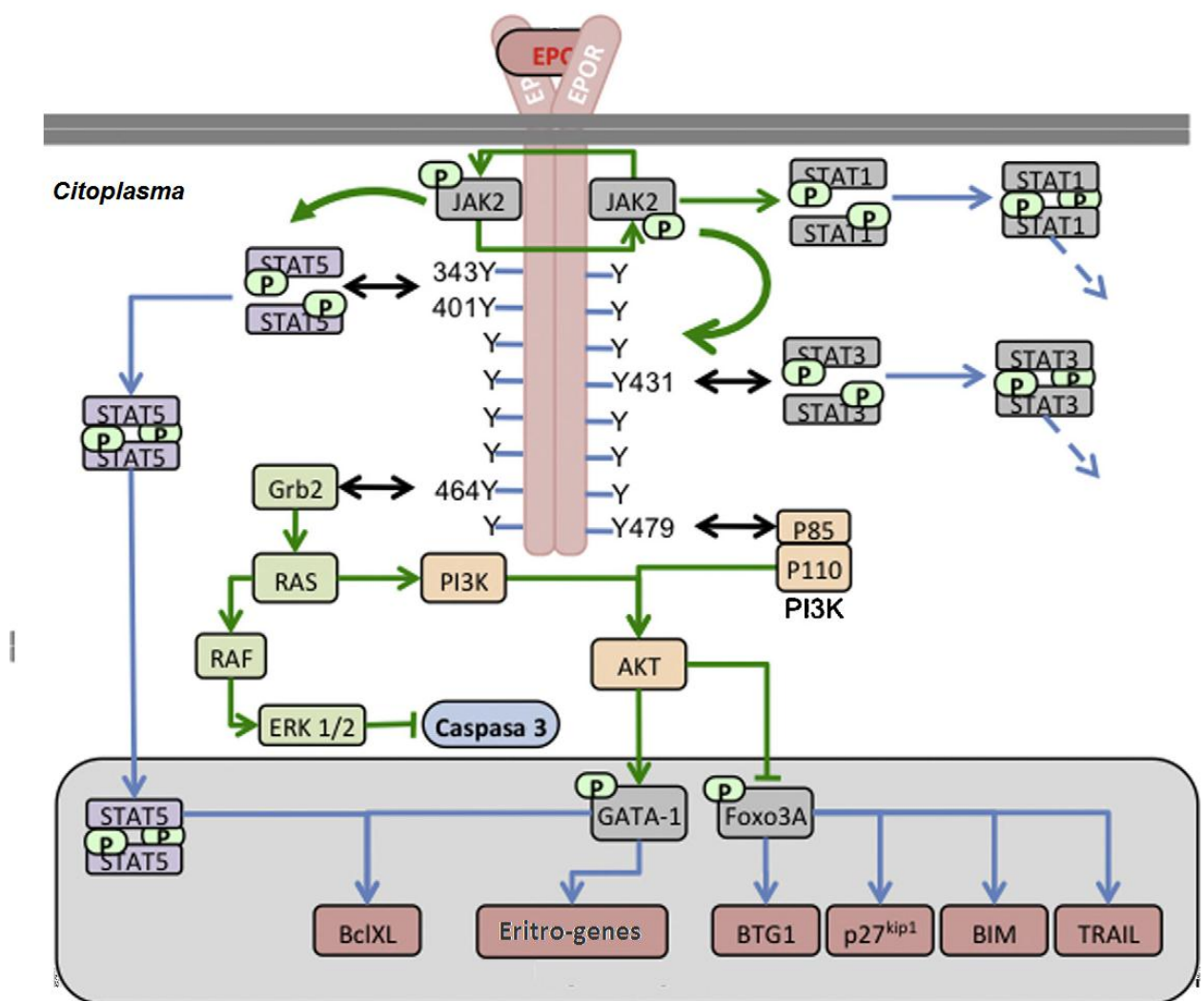


Figura F. Vías de señalización involucradas en la respuesta celular a eritropoyetina. La unión de Epo a su receptor clásico EpoR/EPOR activa a JAK2, que a su vez fosforila al receptor en 8 residuos tirosina. Estos sitios de anclaje reclutan diversas proteínas que desencadenan diferentes vías de señalización, tales como las de STAT5, STAT3, MAPKs (Ras, Raf y ERK1/2), y PI3K/AKT. A partir de estas cascadas de señalización, Epo estimula la transcripción de genes relacionados con la diferenciación eritroide y la antiapoptosis (BclXL), e inhibe aquéllos relacionados con la inhibición de la proliferación (p27^{kip1}) y con la muerte celular apoptótica (TRAIL, BIM), entre otros. Adaptado de Chateauvieux et al. (2011).

Factores de transcripción STAT

Los factores de transcripción STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) contienen dominios SH2, lo que les permite unirse a los sitios de anclaje ofrecidos por los diversos residuos fosfotirosina en el receptor de Epo, donde son, a su vez, fosforilados por JAK2. Una vez activados, los factores STAT dimerizan y traslocan al núcleo. Epo activa STAT1, STAT3 y STAT5a/b (Kirito et al., 1998). Disfunciones en la vía JAK2/STAT5 pueden afectar la proliferación, la diferenciación y la apoptosis en células eritroides, dando lugar a patologías como la policitemia. Esta enfermedad se caracteriza por un incremento en la masa eritroide, ocasionado por activación constitutiva de JAK2 (James et al., 2005), o mutaciones de ganancia de función de EpoR, que generan hipersensibilidad a la Epo en progenitores eritroides (Arcasoy et al., 1999).

Terminación de la señal desencadenada por eritropoyetina

La regulación negativa de la actividad de un receptor de citoquinas modula la magnitud y la duración del estímulo desencadenado por su ligando. En este sentido, así como la activación de la señalización de Epo se establece mediante la actividad quinasa de JAK2, la interacción del complejo Epo/EpoR con fosfatasa es necesaria para la terminación de la señal.

Diferentes autores han involucrado a la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) en la regulación negativa de receptores con función tirosina-quinasa, tales como los de insulina (Goldstein et al., 2000) y Epo (Cohen et al., 2004). Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación han demostrado la terminación de la señal de Epo en células eritroides por PTP1B (Callero et al., 2011, Chamorro et al., 2013).

Por otro lado, también se ha reportado actividad de las fosfatasa SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signalling*) en el apagado de la señal mediada por Epo/EpoR/JAK2 (Croker et al., 2008). Esta familia de proteínas puede actuar inactivando JAK2, impidiendo la unión de proteínas adaptadoras y factores de transcripción al receptor, y ubiquitinando proteínas involucradas en la vía de transducción, con su posterior degradación en proteasoma. La defosforilación de JAK2 mediada por proteínas SHP (*Src Homology Phosphatase*) 1 y 2 (Klingmüller et al., 1995) constituye también un mecanismo de inactivación de la vía a corto plazo.

Tras su inactivación por defosforilación, el complejo Epo/EpoR es rápidamente internalizado y degradado en proteasoma y en lisosomas (Walrafen et al., 2005),

Actividad biológica de la eritropoyetina

En células eritroides

En la médula ósea, Epo actúa sinérgicamente con diversos factores de crecimiento (SCF, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-9 e IGF-1) en la maduración de los progenitores eritroides. Los progenitores más inmaduros, denominados BFU-E (*Burst Forming Units - Erythroid*), presentan un alto potencial proliferativo y pocos receptores para Epo. La maduración implica un aumento de la expresión de EpoR, que se hace máxima en los estadios de CFU-E (*Colony Forming Units - Erythroid*) y proeritroblastos (**Figura G**). En estas etapas de mayor sensibilidad a Epo, la citoquina activa vías de señalización relacionadas con la proliferación celular y la inhibición de la muerte celular apoptótica, mediante un aumento de la expresión de factores de transcripción eritroides (GATA1, SCL/TAL1 y KLF1) y de su propio receptor (Elliot y Sinclair, 2012).

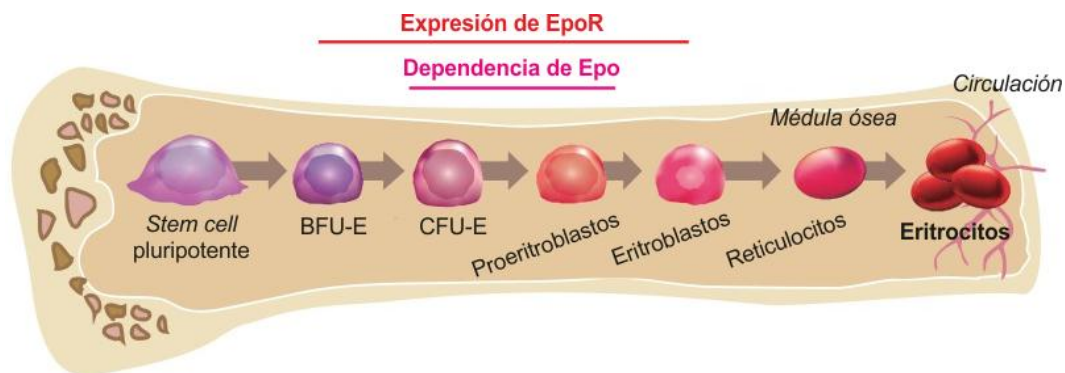


Figura G. Función eritropoyética de Epo. La expresión de EpoR en progenitores eritroides de médula ósea alcanza niveles máximos en los estadios de BFU-E (*burst-forming unit-erythroid*) y CFU-E (*colony-forming unit-erythroid*). En estas etapas, la dependencia de Epo se relaciona con sus efectos proliferativos y antiapoptóticos. Imagen adaptada de Elliot y Sinclair (2012).

En el estadio de proeritroblasto, Epo estimula la secreción de *eritroferrona*, un inhibidor de la hepcidina hepática, que aumenta la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis (Kautz et al., 2014). Existen pocos reportes sobre la detección de EpoR en los estadios de reticulocito y eritrocito.

En otros tejidos

Además de estimular la supervivencia celular en el linaje eritroide, Epo ejerce diversos efectos, principalmente citoprotectores, en tejidos extrahematopoyéticos:

- ✦ **Miocardio:** En modelos animales de isquemia-reperfusión, la administración de Epo disminuyó la pérdida de miocardiocitos mediante la inhibición de apoptosis (Tramontano et al., 2003; Moon et al., 2003) y redujo la inflamación (Rui et al., 2005). Epo también promovió la neovascularización del área infartada del miocardio (Kawachi et al., 2012).

- ✦ **Endotelio:** Se ha demostrado que Epo es capaz de estimular la producción de óxido nítrico endotelial con efectos sobre el tono vascular (D'Uscio et al., 2007; Sautina et al., 2010). Por otra parte, su participación en la angiogénesis se ha demostrado mediante el reclutamiento de progenitores endoteliales circulantes (Heeschen et al., 2003) y la ya mencionada inducción de neovascularización.
- ✦ **Sistema nervioso:** Las células neuronales secretan Epo en condiciones de hipoxia permitiendo la proliferación y diferenciación de progenitores neurales. En pacientes pediátricos de hipoxia/isquemia cerebral, el tratamiento con Epo redujo el tamaño del área afectada y el daño cerebral asociado, además de promover la oligodendrogénesis (Chatagner et al., 2010, Iwai et al., 2010). Epo también indujo la neovascularización de las áreas isquémicas del cerebro (Wang et al., 2004), ejerciendo un efecto neuroprotector mediante la inhibición de la apoptosis (Villa et al., 2003).
- ✦ **Tejido óseo:** La administración de Epo aceleró la calcificación ósea y restauró la microvasculatura disfuncional en ratones (Holstein et al., 2007).

Eritropoyetina en la clínica

La rHuEpo, junto a sus compuestos derivados capaces de estimular la eritropoyesis (*erythropoietin- stimulating agents*, ESAs), son empleados exitosamente en el tratamiento de la anemia, con una consecuente disminución en la morbilidad asociada y una mejora en la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, estudios clínicos efectuados a gran escala sugieren la posibilidad de riesgos asociados a la administración de Epo como terapia correctora de la anemia. En este sentido, el descubrimiento reciente de diferentes tejidos blanco de la acción no eritropoyética de Epo ha alertado sobre posibles efectos adversos del tratamiento con esta citoquina.

Uno de los principales efectos desfavorables observados en el tratamiento con Epo se relaciona con el incremento del riesgo cardiovascular. La administración de Epo ha sido vinculada con el desarrollo de hipertensión arterial, debido a su acción sobre la producción de endotelina-1, prostaglandina-2 y tromboxanos, y la activación del sistema renina-angiotensina (Lee et al., 2007). El tratamiento con altas dosis de Epo también induce un estado protrombótico, que junto al aumento de la viscosidad de la sangre, debida al mayor número de eritrocitos, aumenta la probabilidad de complicaciones por trombosis (Tobu et al., 2004).

Por otro lado, ciertos desórdenes que favorecen el estrés oxidativo y la generación de un ambiente inflamatorio, tales como diabetes mellitus, infecciones y enfermedades autoinmunes, se correlacionan con una menor respuesta al tratamiento con Epo, y pueden incrementar el riesgo de eventos cardiovasculares ya que requieren dosis mayores de ESAs para corregir el

cuadro de anemia. El estrés oxidativo y la inflamación no sólo acortan la vida media de los eritrocitos circulantes, sino que también afectan la producción renal de Epo y reducen la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis, a través de la inducción de la hepcidina hepática (Nemeth et al., 2004; Dallalio et al., 2006).

Ensayos preclínicos en modelos animales y estudios clínicos en pacientes han permitido postular a la Epo y a sus derivados como agentes neuro y cardioprotectores. Sin embargo, la estimulación indeseada de la eritropoyesis podría traer aparejados efectos nocivos tales como el desarrollo de policitemia, hipertensión y trombosis. En este sentido, el *doping* por Epo es un ejemplo del uso indebido de ESAs. Dado que la disponibilidad de O₂ en el tejido muscular es fundamental para quienes practican actividades deportivas de alto rendimiento, la administración de rHuEpo tiene un efecto positivo en la *performance* atlética, ya que ocasiona un incremento en el número de eritrocitos y, en consecuencia, en la incorporación de O₂ tisular. Sin embargo, accidentes por poliglobulia pueden afectar severamente la salud de los atletas. Entre 1987 y 1990 fueron reportados los decesos de veinte ciclistas belgas y holandeses debidos a problemas cardiovasculares presumiblemente asociados al *doping* con Epo. Por este motivo, el Comité Olímpico Internacional decidió en 1990 incluir a la rHuEpo en su lista de sustancias prohibidas (Citartan et al., 2014).

El incremento en la masa eritroide, agravado por la disminución del volumen de plasma por deshidratación durante el ejercicio físico, aumentan la viscosidad de la sangre, y con ella la resistencia vascular en forma independiente del diámetro de los vasos. En estas condiciones se requieren contracciones cardíacas más potentes para permitir la circulación de la sangre. Berglund y Ekblom (1991) reportaron que la administración de rHuEpo (≈ 30 U/kg, durante 6 - 7 semanas) a adultos sanos no provocó diferencias en la presión sistólica o diastólica en condiciones de reposo o actividad física liviana, pero incrementó notablemente la presión sistólica durante ejercicio de intensidad moderada. La hipertensión del ejercicio representa un potencial factor de riesgo en atletas que emplean Epo. Además, el flujo lento asociado a hematocritos muy altos ($\sim 55\%$) podría ser la causa de eventos tromboembólicos y estasis venosa en vasos pequeños.

II. Compuestos derivados de la eritropoyetina

La necesidad de separar el efecto eritropoyético de la actividad citoprotectora de la molécula de Epo, así como de mejorar su farmacocinética, ha dado lugar a la búsqueda de diferentes compuestos derivados de la eritropoyetina.

Agentes estimulantes de la eritropoyesis

Actualmente se conoce como “agentes estimulantes de la eritropoyesis” a un amplio grupo de compuestos (Deicher et al., 2004):

- ✦ **Epoetinas:** ESAs de primera generación. Presentan la misma estructura primaria que la Epo endógena, pero una mayor proporción de carbohidratos, principalmente ácido siálico. Las epoetinas *alfa* (Eprex) y *beta* (Neorecormon) son producidas en células CHO (*Chinese hamster ovary cells*) transfectadas con el gen de la Epo humana. La epoetina beta presenta un mayor peso molecular y un mayor número de isoformas básicas que la epoetina alfa, dado su menor contenido de residuos sialilados, y se metaboliza más lentamente. La epoetina *omega* (Epomax) es producida en células BHK (*baby hamster kidney cells*), y solo se encuentra O-glicosilada en un 60%. La epoetina *delta* (Dynepo), aprobada para el tratamiento de la anemia por insuficiencia renal en 2002 por autoridades europeas, es una Epo recombinante producida en células transformadas genéticamente para expresar el gen de Epo bajo el control de una nueva secuencia regulatoria, introducida con el fin de evitar inconvenientes en el plegamiento postraduccionales debidos a su expresión en células de otras especies.
- ✦ **Darbepoetina (Aranesp):** ESA de segunda generación. Se trata de un análogo hiperglicosilado de mayor vida media (aproximadamente 26 h) y actividad biológica. Es producida en células CHO, pero su estructura primaria difiere de la Epo endógena en cinco posiciones, que permiten la introducción de dos N-glicosilaciones en los residuos Asn30 y Asn88, sin alterar la conformación de la molécula.
- ✦ **Metoxi-polietilenglicol-epoetina beta (Mircera):** Este compuesto es un activador continuo del receptor de Epo (*Continuous Epo Receptor Activator*, CERA). Se produce a partir de rHuEpo, a través de la unión de ácido polietilenglicol butanoico al N-terminal o al grupo ϵ -amino de los residuos lisina presentes. La duración de su unión a EpoR es menor comparada con la de otros ESAS, lo que le permite varios ciclos de unión, estimulación y disociación antes de que el receptor se internalice. Su vida media *in vivo* es de alrededor de 135 h.

Derivados no eritropoyéticos de la eritropoyetina

Eritropoyetina carbamilada (cEpo)

La carbamilación de un péptido involucra una reacción entre el ácido isociánico, que se disocia dando ión cianato, y los grupos amino presentes en los aminoácidos lisina y arginina, así como en los extremos N-terminales de las proteínas (**Figura H**). La interacción se produce entre las cargas negativas del cianato y las positivas de los grupos amino, resultando en una unión irreversible que enmascara la carga superficial positiva del aminoácido.

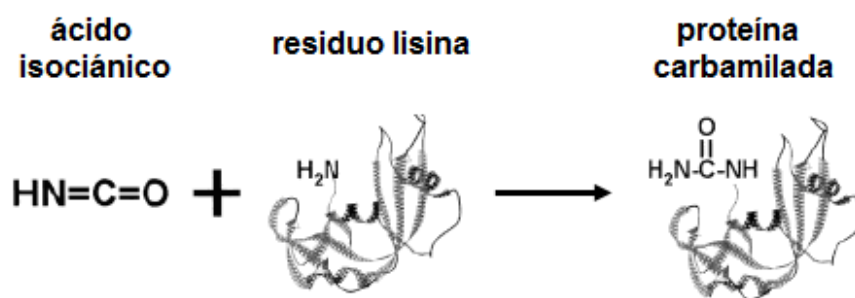


Figura H. Esquema de la reacción de carbamilación de una proteína. Se muestra, a modo de ejemplo, la carbamilación de un residuo lisina, que resulta en la conversión a homocitrulina.

La carbamilación a partir del cianato generado por descomposición de la urea en cianato y amonio es un evento relacionado al envejecimiento de las proteínas *in vivo*, que, exacerbado, puede contribuir a procesos patológicos. Pietrement et al. (2013) demostraron que el incremento de urea producido en la enfermedad renal crónica aumenta la presencia de proteínas carbamiladas en plasma y en tejidos, en correlación con un mayor riesgo de mortalidad por eventos cardiovasculares.

La carbamilación total de la molécula de Epo (Warren Pharmaceuticals) provoca la modificación irreversible de sus ocho residuos lisina a homocitrulina. Estos cambios estructurales dan lugar a la pérdida de su actividad eritropoyética, así como su capacidad de unirse al receptor clásico EpoR-EpoR, pero sin alterar las propiedades citoprotectoras de la Epo (Leist et al., 2004, Park et al., 2004; Brines et al., 2000; Chamorro et al., 2013). Se ha postulado que cEpo, al igual que Epo, ejerce sus efectos protectores a través de un receptor heterodimérico, formado por una subunidad EpoR y una subunidad del receptor β -common (βCR), también involucrado en la señalización de GM-CSF, IL-3 e IL-5 (Jubinsky et al., 1997; Chamorro et al., 2013).

Las propiedades neuro y vasculoprotectoras de cEpo han sido evaluadas en ensayos clínicos, en los que se buscó determinar parámetros de seguridad y farmacocinética para el tratamiento del *stroke* isquémico agudo, si bien los resultados aún no han sido publicados. Por otra parte, cEpo también fue estudiada en ensayos clínicos de Fase II para el tratamiento de la ataxia de Friedrich, una enfermedad hereditaria asociada a deficiencia en la proteína frataxina, que se manifiesta con ataxia, cardiomiopatía hipertrófica y diabetes. Tanto Epo como cEpo incrementaron la expresión de frataxina en células K562 y THP-1 (Sturm et al., 2010). Sin embargo, si bien la citoquina modificada fue segura y bien tolerada en pacientes de esta enfermedad, no se observaron diferencias con respecto al placebo en cuanto a biomarcadores tales como los niveles de frataxina, el estrés oxidativo y el grado de ataxia (Boesch et al., 2014).

Otro de los derivados de Epo desarrollados con el fin de conservar la acción neuroprotectora sin estimular la eritropoyesis ni ocasionar eventos trombóticos, es el péptido HSBP (*Helix B Surface Peptide*), cuya estructura es similar a la fase hidrofílica de la hélice B de Epo, y exhibe una

actividad citoprotectora comparable a la de la citoquina nativa (Ueba et al., 2010; Ahmet et al., 2011).

III. El endotelio vascular: estructura, función e importancia fisiopatológica

El tejido endotelial es un tipo de epitelio que reviste el interior de los vasos sanguíneos y linfáticos, y se encuentra en contacto con la sangre o la linfa que circula por el lumen de los mismos. Desde el punto de vista histológico, se trata de un epitelio simple plano y constituye la túnica íntima de los vasos sanguíneos (**Figura I**). Las células que lo conforman son elongadas, de aproximadamente 30 μm de largo, y se disponen en forma paralela al sentido del flujo sanguíneo. Si bien la función del endotelio es eminentemente estructural, no constituye un revestimiento inerte, sino que sus células forman una barrera de permeabilidad selectiva con un importante rol en el mantenimiento del tono vascular, la coagulación, la cicatrización de heridas y la respuesta inmune. Por otro lado, el endotelio presenta un rol central en patologías como la arterioesclerosis, la trombosis, la supervivencia y metástasis tumoral, la hipertensión y la diabetes.

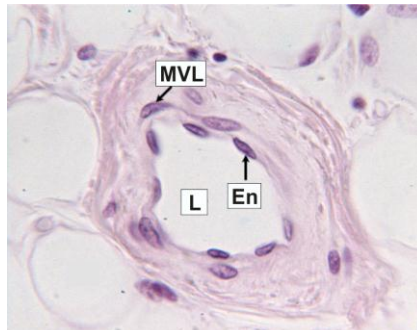


Figura I. Corte histológico de una arteriola. Se observa la túnica íntima formada por el endotelio (En), de núcleos planos, en contacto con el lumen del vaso (L). MVL, fibras de músculo liso vascular (túnica media). Imagen adaptada de http://cmdi.medicine.dal.ca/Human_Histology/Lab8

Células endoteliales y eritroides: un origen común

La hipótesis de un precursor común para las células endoteliales y las células hematopoyéticas fue planteada a principios del siglo XX, a partir de la observación de islotes sanguíneos primarios en el saco embrionario como grupos de células indiferenciadas que luego daban lugar a un *cluster* eritroide interno revestido por endotelio (Maximow, 1909; Sabin, 1920). El *hemangioblasto* fue identificado por Choi et al. (1998). En 2004, Huber et al. demostraron que este tipo de células también puede dar origen a músculo liso, indicando su tripotencialidad.

Los hemangioblastos se originan en el piso ventral de la aorta dorsal, en la región aorta-gónada-mesonefros, a partir de células mesenquimales, y posteriormente se convierten en células pre- endoteliales, con capacidad de diferenciarse dando lugar al linaje hematopoyético o al endotelial (**Figura J**).

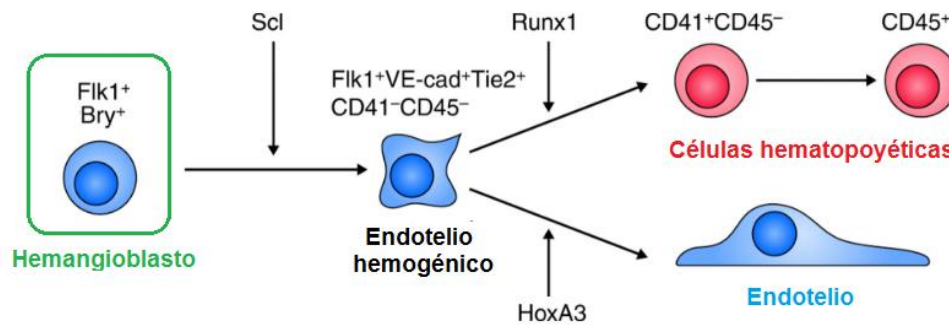


Figura J. El hemangioblasto como precursor de células endoteliales y hematopoyéticas. La formación del endotelio hemogénico depende del gen Scl, mientras que la adquisición del compromiso hacia el linaje hematopoyético depende de Runx1. HOX3 antagoniza el desarrollo hematopoyético, manteniendo el linaje endotelial. Imagen adaptada de Medvinsky et al. (2011).

La presencia de diversos marcadores tanto en células eritroides como en células endoteliales (Flk1, c-kit, CD34, Scl, Tie-2, Gata2, Runx1, y Pecam-1) apoyan la hipótesis de un origen común. De hecho, se ha demostrado que la depleción de Flk1 en embriones impide el desarrollo tanto de células endoteliales como de células hematopoyéticas (Shalaby et al., 1995).

Heterogeneidad del endotelio

Las células endoteliales no constituyen un grupo homogéneo, sino que presentan diferencias morfológicas y funcionales de acuerdo con la especie y el órgano de los cuales provienen, con su pertenencia a un vaso de mayor o menor calibre, o a su origen arterial o venoso. Los vasos sanguíneos que irrigan tumores presentan importantes diferencias con respecto a los normales, presentando alteraciones en su permeabilidad, fenestraciones, ramificación aberrante y sentido de flujo no definido (Denekamp et al., 1982).

De acuerdo con el órgano del cual provienen, las células endoteliales presentan patrones diferenciales de marcadores superficiales, receptores y transportadores. Por ejemplo, el factor von Willebrand (vWF), considerado un marcador del tejido endotelial, se expresa en forma más abundante en el endotelio venoso que en el arterial, y en la macrovasculatura con respecto a los capilares. Por otra parte, el endotelio microvascular posee una mayor capacidad de formar túbulos endoteliales similares a capilares sobre una matriz similar a la extracelular (ensayo de formación de túbulos), y de responder a ciertas citoquinas proangiogénicas. De la misma

manera, células endoteliales embrionarias responden con más facilidad a factores de diferenciación que el endotelio adulto o senescente.

Funciones del endotelio

Como hemos mencionado anteriormente, las funciones desempeñadas por el endotelio son diversas y revisten una gran importancia en procesos tanto fisiológicos como patológicos (Galley y Webster, 2004):

- ✦ **Barrera y transporte selectivo:** El endotelio es una importante barrera al pasaje libre de moléculas y células desde la sangre al espacio intersticial tisular. Las uniones oclusivas (*tight junctions*) en los endotelios continuos pueden funcionar como “compuertas” selectivas, regulando el pasaje de iones, agua y algunas macromoléculas a través de espacios paracelulares, o como “cerchas” impermeables que mantienen la polaridad celular (Sawada et al., 2003). En este sentido, la barrera hematoencefálica y la barrera hematotesticular son ejemplos de endotelios altamente selectivos con función protectora. El transporte mediante vesículas generadas en caveolas de la membrana plasmática se denomina *transcitosis*, y permite el pasaje de moléculas tales como la albúmina. En las caveolas se localizan, además, enzimas como la óxido nítrico sintasa endotelial y canales de calcio. En la membrana plasmática endotelial es importante la presencia de transportadores de glucosa (principalmente GLUT1) y de aminoácidos.
- ✦ **Secreción de matriz extracelular:** Las células endoteliales secretan diferentes componentes de la matriz extracelular, tales como fibronectina, laminina, proteoglicanos y colágeno. La interacción con la matriz circundante a través de integrinas mecanosensibles también puede activar vías de señalización en respuesta al *shear stress* (estrés tangencial vascular), regulando genes relacionados a antiapoptosis, arresto del ciclo celular, remodelación del citoesqueleto y producción de NO en las células endoteliales (Shyy y Chien, 2002).
- ✦ **Hemostasia:** Las células endoteliales secretan una variedad de proteínas que participan directamente en la hemostasia y la coagulación, tales como factores procoagulantes (factor von Willebrand, tromboplastina, factor activador de plaquetas, inhibidor del activador de plasminógeno) y antitrombóticos (prostaciclina, trombomodulina, antitrombina, activador de plasminógeno, heparina).
- ✦ **Mantenimiento del tono vascular:** El endotelio produce sustancias vasodilatadoras (óxido nítrico, prostaciclina) y vasoconstrictoras (tromboxano A₂, leucotrienos, endotelina-1, enzima convertidora de angiotensina) que regulan el tono vasomotor.
- ✦ **Inflamación y adhesión leucocitaria:** Las células endoteliales se encuentran en la interfase entre la sangre y los tejidos, con lo cual cumplen un importante rol en la respuesta inmune y

la inflamación. No solamente regulan el movimiento de leucocitos hacia los tejidos mediante la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y selectinas, sino que también secretan mediadores proinflamatorios como las interleuquinas 1, 6 y 8 y los leucotrienos. En cáncer o enfermedades inflamatorias crónicas, la producción de quimioquinas por parte de las células endoteliales contribuye a la anti-inflamación sistémica induciendo la liberación a la circulación de receptores *decoy* inhibitorios de la acción de TNF- α e IL-1.

- ✦ **Secreción de factores de crecimiento:** En respuesta a estimulación con citoquinas, antígenos bacterianos, hipoxia y otros mediadores, las células endoteliales secretan factores de crecimiento tales como *transforming growth factor* (TGF), *insulin-like growth factor* (IGF) y *colony-stimulating factor* (CSF).
- ✦ **Angiogénesis:** Junto a la acción proinflamatoria y a la generación de un estado protrombótico, la angiogénesis es uno de los procesos que marcan la activación endotelial. Este no involucra solamente la proliferación y la motilidad celular, sino también la secreción de metaloproteasas remodeladoras de la matriz extracelular.

Angiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este proceso es regulado finamente por factores pro y anti angiogénicos, e involucra la proliferación y migración de células endoteliales maduras, así como también el reclutamiento de progenitores endoteliales circulantes.

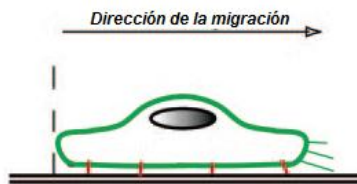
La angiogénesis es un componente esencial de procesos fisiológicos tales como el desarrollo embrionario, la cicatrización y la regeneración tisular. Sin embargo, también es un factor clave en diversas manifestaciones clínicas. El cáncer, las retinopatías, la psoriasis, la degeneración macular asociada a la edad y las enfermedades inflamatorias y autoinmunes constituyen un grupo de patologías que podrían verse beneficiadas por una inhibición de la angiogénesis. Por otro lado, terapias proangiogénicas podrían mejorar la condición de pacientes con enfermedad arterial coronaria, *stroke* y deficiencias en la cicatrización.

El cáncer es una patología íntimamente relacionada con la angiogénesis, debido a que la supervivencia y consecuente metástasis de tumores sólidos depende de la neovascularización del tumor primario, permitiendo un suministro adecuado de oxígeno y nutrientes (Folkman y Shing, 1992). El empleo de terapias antiangiogénicas como el bevacizumab —un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)— en combinación con drogas citotóxicas o radiación puede maximizar las posibilidades de éxito del tratamiento. Se ha propuesto, además, que la terapia antiangiogénica puede normalizar la vasculatura aberrante de los tumores favoreciendo la distribución de los agentes quimioterapéuticos (Jain, 2001).

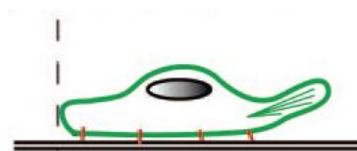
En este contexto, resulta importante la investigación de compuestos con potenciales efectos sobre la angiogénesis, con el fin de emplearlos terapéuticamente en patologías dependientes de este proceso.

Etapas de la migración celular

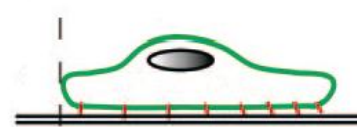
La migración celular en respuesta a un estímulo consiste de diferentes etapas, en las que participan diversos actores (imágenes adaptadas de Lamalice et al., 2007).



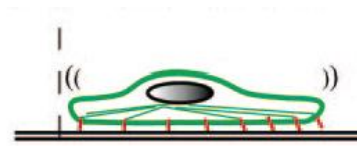
1. Sensado: el sensado del estímulo y su dirección es realizado a través de *filipodios*, proyecciones formadas por grupos de filamentos de actina cubiertos de membrana. La formación de estas estructuras depende de la GTPasa Cdc42.



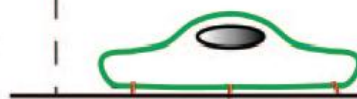
2. Extensión: Posteriormente, la célula extiende una protrusión conocida como *lamelipodio*, que contiene una densa red cortical de filamentos de actina. La polimerización de la misma involucra a la proteína Rac1 y al complejo Arp2/3, y su ramificación requiere de la proteína cortactina.



3. Adhesión: La adhesión celular al sustrato depende de complejos proteicos, denominados adhesiones o contactos focales, que median el anclaje del citoesqueleto a integrinas. Participan de estos focos de adhesión la tirosina quinasa FAK (*Focal Adhesion Kinase*) y las proteínas vinculina, talina y paxilina.



4. Contracción y despegado de la parte trasera: Una vez estabilizadas las adhesiones focales en el frente de avance de la célula, la célula migrante debe contraer su parte posterior a fin de liberarla. Esto ocurre mediante *fibras de estrés*, grupos de filamentos de actina asociados a miosina II y tropomiosina y anclados en las adhesiones focales que contraen el cuerpo celular y despegan la parte opuesta a la dirección de movimiento mediante fuerzas de tracción. Es importante la fosforilación de la cadena liviana de miosina (MLCK) por acción de FAK, además del clivaje de las proteínas de los complejos focales por la proteasa dependiente de calcio calpaína.



5. Reciclaje: En cada "paso" hacia la fuente de estímulo, se produce un reciclaje de componentes tales como las integrinas desde la región despegada hacia la parte anterior. La coordinación entre el desensamblado, el reciclado y el transporte activo es indispensable para mantener el equilibrio de adhesiones focales requerido para una migración continua.

Intermediarios y efectores de la migración celular

Calcio

En células migrantes se establece un gradiente de calcio, siendo mayor la concentración en la parte posterior, donde se requiere la contracción y el despegado mediados por proteínas contráctiles y proteasas dependientes de este catión (**Figura K**). En el frente de avance el contenido intracelular de Ca^{2+} es muy inferior, debido a una expresión localizada de la ATPasa PMCA que bombea Ca^{2+} hacia el medio extracelular. El bajo umbral de Ca^{2+} permite la generación de pulsos (aumentos transientes) de este catión por factores proangiogénicos tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). La dinámica de entrada y salida del calcio intracelular asegura la migración continua, con modificaciones inmediatas en la activación y la integridad de las proteínas involucradas, así como cambios en la expresión de ciertos genes.

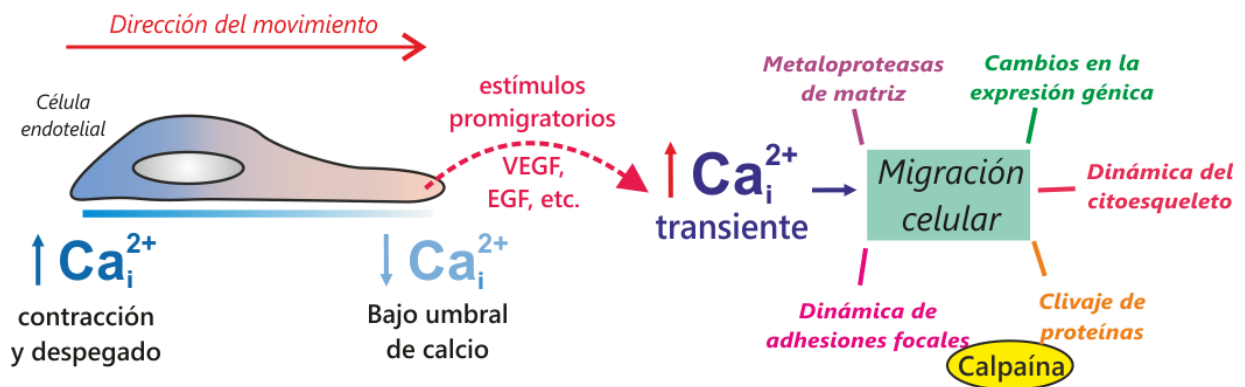


Figura K. Participación del calcio en la migración celular. El establecimiento de un gradiente de Ca^{2+} intracelular permite la generación de pulsos de calcio en la región anterior de la célula migrante debidos a la acción de factores proangiogénicos. Estos pulsos de Ca^{2+} tienen efecto sobre la secreción de metaloproteasas (MMPs) de matriz extracelular, la dinámica del citoesqueleto y de las adhesiones celulares, y cambios en la actividad de genes relacionados al proceso de migración.

Especies reactivas de oxígeno

El uso de sondas para especies reactivas de oxígeno ha permitido detectar su producción mediada por factores de crecimiento como la angiotensina-II, mientras que ensayos en células HUVEC atribuyeron un importante papel a O_2^- y a H_2O_2 en la quimiotaxis (Harfouche et al., 2005). La generación de estas entidades químicas ha sido localizada en los complejos focales del lamelipodio, donde se encuentra secuestrada la subunidad adaptadora p47 de la NADPH oxidasa (Wu et al., 2005). Por otro lado, el ambiente oxidativo es requerido para mantener la inhibición de la fosfatasa de FAK, impidiendo la inactivación de esta quinasa y preservando así la señalización migratoria (Chiarugi et al., 2003).

Óxido nítrico

Ratones *knock out* para la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) mostraron inhibición de la angiogénesis en respuesta a isquemia (Yu et al., 2005). eNOS se localiza en caveolas de membrana, donde la caveolina-1 regula negativamente su actividad. Se ha reportado que la caveolina-1 también se asocia al receptor tipo 2 de VEGF (VEGFR2), y que este complejo es disociado por la unión de VEGF (Labrecque et al., 2003; Maniatis et al., 2006). Una posible explicación para el efecto proangiogénico de NO *in vivo* es que, al producir vasodilatación, aumenta la superficie de exposición a agentes promigratorios (Lamallice et al., 2007).

Acuaporina-1

La acuaporina-1 (AQP-1) es una proteína transmembrana de expresión constitutiva en diversos tejidos, que permite el pasaje de agua y algunos solutos pequeños. Fue descubierta como una aparente impureza en una preparación de membranas de glóbulos rojos, a partir de las cuales se pretendía purificar antígenos Rh (Agre et al., 1987). El polipéptido encontrado existía en dos formas: una no glicosilada de 28 kDa, que le valió el nombre de CHIP28 (*CH*annel-*l*ike *I*ntegral *P*rotein of 28 *kDa*), y una forma *N*-glicosilada de peso molecular variable, que presentaban baja afinidad por el colorante Coomassie. El análisis de la secuencia aminoacídica relacionó a CHIP28 con una familia putativa de canales de membrana, entre los cuales se encontraba la proteína intrínseca del cristalino (*Major Intrinsic Protein* o MIP, denominada actualmente AQP-0). Este hallazgo, sumado a la expresión abundante del polipéptido en eritrocitos y en túbulo proximal renal, permitió proponer a CHIP28 como una proteína canal de agua, cuyo nombre fue posteriormente modificado a acuaporina-1.

Estructuralmente AQP-1 consta de dos repeticiones en tándem (**Figura L**), cada una formada por tres dominios transmembrana y un *loop* hidrofóbico altamente conservado, dispuestas a 180° una con respecto a la otra (Agre et al., 2002).

La AQP-1 se encuentra en membrana formando tetrámeros por unión no covalente. La estructura tridimensional de AQP-1 permite la formación de un estrecho poro central a partir de la superposición de los *loops* B y E entre ambas hemicapas de la membrana plasmática. El pasaje de una columna continua de moléculas de agua a través de este poro es conocido como el “modelo de reloj de arena” (*hourglass model*).

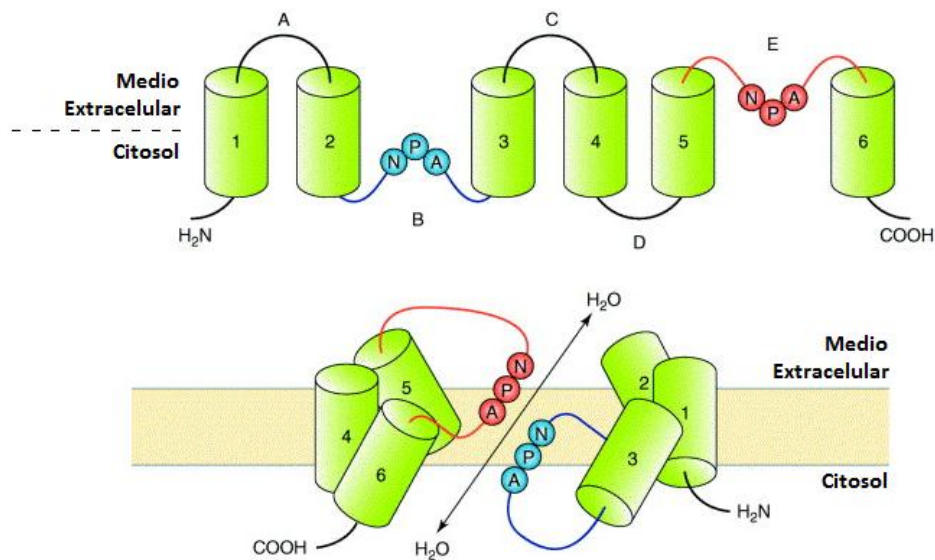


Figura L. Estructura de AQP-1. Acuaporina-1 es una proteína de seis α -hélices transmembrana (1 – 6), unidas entre sí por cinco *loops* (A - E), que forman dos repeticiones en tándem (hélices 1, 2 y 3; y hélices 4, 5 y 6). La proteína se dispone en membrana de forma tal que sus *loops* B y E forman un poro central exponiendo el motivo consenso NPA (Asn-Pro-Ala). Los residuos Asn forman un ambiente polar que permite el pasaje de agua y solutos pequeños a favor del gradiente osmótico. Imagen adaptada de Zeuthen et al. (2001).

Las acuaporinas poseen una alta especificidad por el transporte de agua, previniendo el pasaje de iones y otros solutos a través de la membrana. El pasaje de protones debe ser prevenido, ya que el movimiento de cargas positivas a través de la membrana puede desencadenar diversos procesos biológicos. Dentro del poro de la acuaporina, la columna de moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno puede conducir protones (H_3O^+) con gran eficiencia (efecto Grotthus); sin embargo, no se ha detectado conductividad de protones en AQP-1. La estructura de reloj de arena de AQP-1 involucra dos “vestíbulos” cónicos en los extremos extracelular e intracelular del poro, ambos llenos de agua (**Figura M**). En el segmento más estrecho, el diámetro del poro es de aproximadamente 3 Å, apenas suficiente para permitir el pasaje de una molécula de agua (con un diámetro de 2,8 Å), lo cual bloquea el transporte de iones y otros solutos de mayor tamaño. Por otro lado, los residuos Arg195 e His180 (parcialmente positivo a pH neutro) repelen electrostáticamente el pasaje de cargas positivas.

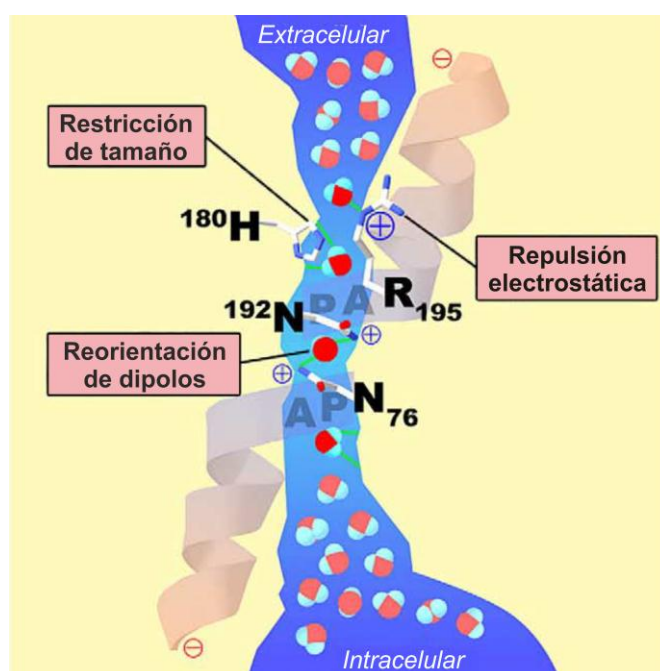


Figura M. Modelo de reloj de arena (*hourglass model*) para el transporte de agua a través de AQP-1. Considerando un flujo desde el medio extracelular hacia el citosol, las moléculas de agua ingresan a través de un “vestíbulo”, a partir del cual descenden por el poro como una columna unida por puentes de hidrógeno. En la región más estrecha, los residuos His180 y Arg195 no solo impiden estéricamente el ingreso de solutos de gran tamaño, sino que repelen el pasaje de protones. Los residuos Asn192 y Asn76, junto a grupos carbonilo, ofrecen a las moléculas de agua sitios alternativos de interacción, rompiendo la columna y favoreciendo el pasaje rápido de agua por el poro. Como resultado de la interacción con Asn, las moléculas de agua reorientan sus dipolos. Imagen adaptada de Agre y Kozono (2003).

El hallazgo de que la energía de activación para el pasaje de agua a través de AQP-1 es de magnitud semejante a la de los puentes de hidrógeno sugirió que la ruptura de este tipo de uniones, con la consecuente interrupción de la columna de agua, fuese necesaria para el flujo a través del poro. En este sentido, la presencia de residuos Asn y de grupos carbonilos pertenecientes a la cadena carbonada son sustitutos energéticamente favorables para el establecimiento de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. La presencia de relativamente pocos sitios de interacción entre el agua y la pared del canal contribuye a la rapidez del flujo dentro del mismo (Murata et al., 2000; Agre y Kozono, 2003).

Las acuaporinas son inhibidas principalmente por metales como Au^{3+} , Ag^+ y Hg^{2+} , siendo el mercurio el más potente (IC_{50} : 10 μM), y también en forma menos eficaz por tetraetilamonio y acetazolamida (Yang et al., 2006). Hg^{2+} se une al residuo Cys189 del *loop* E, bloqueando de esta manera el poro (Gao et al., 2012). La búsqueda de inhibidores farmacológicos de AQPs que permitan evitar la citotoxicidad de los metales ha conducido a la síntesis de derivados de diuréticos como la bumetanida. Entre ellos, el compuesto AqB013 es capaz de bloquear el pasaje de agua a través de AQP-1 (IC_{50} : 20 μM) ocluyendo el poro desde la cara citoplasmática (Migliati et al., 2009). Este inhibidor fue capaz de impedir la migración de células de cáncer de colon y la

formación de túbulos por células endoteliales (Dorward et al., 2016), dos procesos en los cuales es reconocida la participación de la acuaporina.

La importancia de AQP-1 en la migración celular radica en el papel que cumplen en la formación del lamelipodio. Este proceso requiere del ingreso osmótico de agua, generado por una mayor concentración de solutos en la región de avance (**Figura N**). Además de la despolimerización del citoesqueleto de actina, es necesaria la actividad de canales iónicos y transportadores para generar el influjo de agua (Schwab et al., 2001). La actividad paralela de los intercambiadores Na^+/H^+ (NHE1) y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE1), y de cotransportador $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-$ (NBC1) generan la presión osmótica necesaria para permitir el ingreso de agua a través de canales de AQP-1. Esta serie de eventos da lugar al estiramiento de la membrana plasmática y al ingreso de Ca^{2+} , que desencadena mecanismos de contracción en los que participa el citoesqueleto (Belge y Devuyst, 2006).

Hasta el momento no existen reportes que vinculen la participación de AQP-1 con el efecto promigratorio de eritropoyetina en células endoteliales.

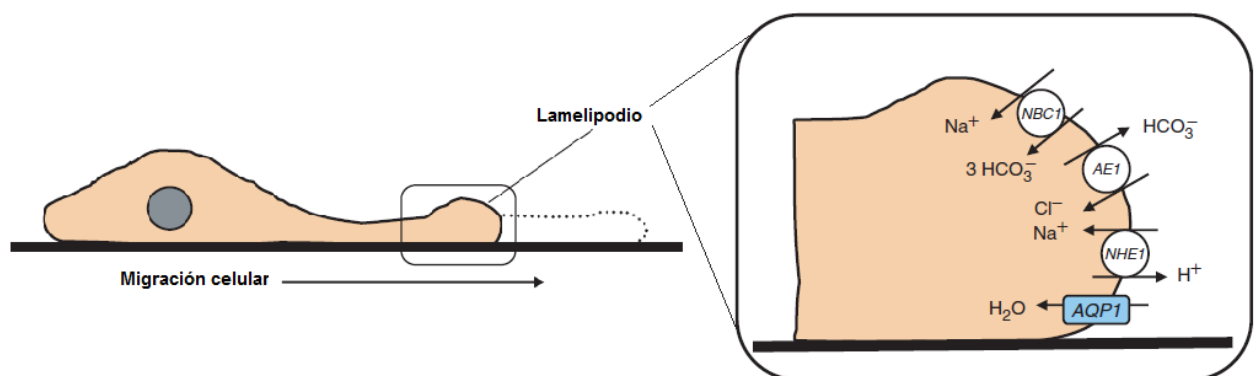


Figura N. Mecanismo de formación del lamelipodio mediante canales iónicos y AQP-1. Imagen adaptada de Belge y Devuyst (2006).

Hipótesis y Objetivos

Las funciones realizadas por el endotelio vascular revisten gran importancia tanto en condiciones fisiológicas como en procesos patológicos. Evidencia experimental reportada en diversos trabajos de investigación propone a la Epo como un factor proangiogénico, si bien no se ha dilucidado aún la participación de sus receptores clásico y alternativo, las vías de señalización activadas y los elementos de la maquinaria de migración celular que resultan blanco de su acción. Por otra parte, el efecto de la carbamilación de la molécula de Epo sobre su actividad biológica ha sido descrito anteriormente en células eritroides, pero existe escasa y contradictoria información acerca de su acción sobre células endoteliales.

Hipótesis

La Epo y su derivado carbamilado comparten un efecto protector frente al daño oxidativo y la apoptosis en diversos tipos celulares. Sin embargo, a partir de la diferencia fundamental demostrada entre ambas citoquinas, relacionada con la proliferación y diferenciación de células del linaje eritroide, y conociendo el origen común de las células eritropoyéticas y las células endoteliales, enunciamos la siguiente hipótesis de trabajo:

Epo es capaz de activar la funcionalidad del endotelio, pero la modificación por carbamilación introduce cambios en la actividad biológica de esta citoquina en células endoteliales.

Los antecedentes reportados y las posibilidades terapéuticas que podrían ofrecer estas moléculas sustentan la importancia de realizar un estudio comparativo de la actividad de ambas eritropoyetinas en células endoteliales, con particular interés en sus mecanismos de acción.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de Tesis doctoral es aportar nuevos datos sobre los efectos y mecanismos de acción de Epo sobre el endotelio, al mismo tiempo que se busca dilucidar si la carbamilación de la molécula de Epo introduce algún cambio en su actividad biológica.

Objetivos específicos

En el marco del objetivo general planteado, surgen los siguientes objetivos específicos:

- Investigación y análisis comparativo de la acción proangiogénica de Epo y cEpo, a partir del estudio de los procesos de proliferación, migración y formación de túbulos de células endoteliales.
- Estudio de caminos de señalización intracelulares activados por Epo y cEpo sobre células endoteliales, y de la participación de la fosfatasa PTP1B en el mecanismo de cierre de señal de

ambas eritropoyetinas. Participación de los receptores homodimérico (EpoR) y heterodimérico (EpoR/ β -common) de Epo.

- Evaluación de la acción protectora de Epo y cEpo sobre células endoteliales frente a agentes oxidantes y proapoptóticos.
- Determinación de la participación del calcio y canales de este catión en la actividad proangiogénica de Epo.
- Estudio de los efectos de ambas eritropoyetinas sobre el proceso angiogénico en un contexto inflamatorio.
- Investigación de la participación de acuaporina-1 (AQP-1) y de la interacción entre AQP-1 y distintos intermediarios o efectores de la citoquina en el proceso de angiogénesis modulado por Epo.

Materiales y Métodos

I. Equipos, *software* y reactivos

I.1 Equipos

- ✦ Centrífuga refrigerada HERMLE Z323K.
- ✦ Citómetro de flujo FACS ARIA (BD) (Servicio de Citometría, FCEN, UBA).
- ✦ Cuba electroforética Liberty 2 (Biokey American Instruments, Inc. USA) para fragmentos de RT-PCR.
- ✦ Cuba electroforética (Miniprotean III, Bio-Rad) para SDS-PAGE y electrotransferencia.
- ✦ G:BOX Chemi System acoplado a cámara digital (Departamento de Química Biológica, FCEN).
- ✦ Equipo para la obtención de agua ultra-pura Millipore Simplicity 185.
- ✦ P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter), equipado con detector de arreglo de diodos (Photo Diode Array, PDA) y filtro de 214 nm.
- ✦ Espectrofotómetro (Beckman DB).
- ✦ Estufa de cultivo (Revco RMI 3000S-7VBA).
- ✦ Flujo Laminar Cámara de bioseguridad de clase II (Nuair).
- ✦ Fuente de poder (EPS 600, Pharmacia).
- ✦ Lector de microplacas (BioRad Modelo 680).
- ✦ Microscopio Nikon XS100.
- ✦ Microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 135), con cámara digital acoplada (Nikon Coolpix 5000).
- ✦ Microscopio Confocal (Olympus FV300/Bv61) (Servicio de Microscopía Confocal, FCEN, UBA).
- ✦ NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).
- ✦ Termociclador Eppendorf (Mastercycler gradient) para RT-PCR.
- ✦ Termociclador Bio-Rad iCycler iQ5 para *Real-Time* RT-PCR.

I.2 Software

- ✦ AxioVision (toma de fotos en visible y fluorescencia y análisis de las mismas).
- ✦ BioRad CFX Manager (análisis de *real-time* RT-PCR).
- ✦ FloJo 7.6 (análisis de resultados de citometría de flujo).
- ✦ FV10 ASW viewer (análisis de imágenes de microscopía confocal).
- ✦ GeneSys (toma de fotografías de geles en G:Box).
- ✦ GraphPad Prism 6 (análisis estadístico).
- ✦ ImageJ (densitometría de bandas y recuento de células a partir de fotografías).

I.3 Reactivos y anticuerpos

Todas las sales, ácidos y solventes utilizados fueron de calidad analítica (Merck, Mallinckrodt, Sigma-Aldrich o similar).

Amersham - GE:

- ✦ Dietilpirocarbonato (DEPC)
- ✦ dNTPs

- ✦ Membrana de nitrocelulosa

BD Biosciences:

- ✦ Anticuerpo primario anti-PARP-1, monoclonal, ratón (4C10-5)
- ✦ Kit para detección de apoptosis Anexina V-FITC / Ioduro de propidio
- ✦ Reactivos Cytofix/Cytoperm y PermWash

Biodynamics S.R.L:

- ✦ Agarosa
- ✦ Marcador de número de pares de base

Biosidus

- ✦ rHuEpo Hemax®

Calbiochem:

- ✦ Inhibidores de JAK2 (AG490) y de PI3K (LY294002)

Cell Signaling

- ✦ Anticuerpos primarios anti-fosfoJAK2 (Tyr1007/1008, monoclonal, conejo), anti-AKT (monoclonal, conejo) y anti-fosfoAKT (Ser473, monoclonal, conejo)

Fermentas:

- ✦ Marcador de peso molecular precoloreado para geles de poliacrilamida

Gibco / Invitrogen / ThermoFisher Scientific:

- ✦ Anti IgGs de conejo y de ratón conjugados con Alexa-Fluor 488
- ✦ Bromuro de etidio
- ✦ 2,4-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)
- ✦ Dimetilsulfóxido (DMSO).
- ✦ Geltrex (sustrato similar membrana basal)
- ✦ Lipofectamina 3000 para transfección celular
- ✦ LSGS kit para el cultivo de células endoteliales HUVEC
- ✦ Medios de cultivo MEM (*Minimum Essential Medium*), Ham F12, RPMI-1640, IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), M199 y OptiMEM
- ✦ Primers contra GAPDH, EpoR, TNFR1, AQP-1, β cR
- ✦ siRNA contra AQP-1
- ✦ Suero fetal bovino (ensayo de túbulos sobre sustrato similar matriz extracelular)
- ✦ Taq polimerasa
- ✦ TNF- α (actividad específica: $5 \times 10^7 - 2 \times 10^7$ U/mg)
- ✦ TRIzol
- ✦ TrypLe Select (agente de disociación celular)

Sigma Aldrich:

- ✦ Antagonistas de canales de calcio amlodipina y diltiazem
- ✦ Anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón acoplados a peroxidasa para revelado de membranas de *Western blotting*.
- ✦ Colorante azul Tripán
- ✦ Colorante Hoechst 33258
- ✦ Dimetilsulfoxido (DMSO)
- ✦ EDTA y EGTA
- ✦ Inhibidores de proteasas fenilmetilsulfonyl fluoruro (PMSF) y leupeptina
- ✦ 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT)
- ✦ Quinina
- ✦ Staurosporina (STP)

ICN Biomedicals:

- ✦ Paraformaldehído

ZELLTEK S.A.

- ✦ Eritropoyetina recombinante humana purificada (rHuEpo). Actividad específica: 125 UI/μg.

Santa Cruz Biotechnology Inc:

- ✦ Anticuerpos primarios anti-Epo (B-4, monoclonal, ratón), anti-EpoR (M-20, policlonal, conejo), anti-β-common (1C1, monoclonal, ratón), anti-PTP1B (H-135, policlonal, conejo), anti-β-actina (C4, monoclonal, ratón) y anti-AQP-1 (H55, policlonal, conejo)
- ✦ CinnGel 2Me (inhibidor de PTP1B)
- ✦ siRNAs específicos contra EpoR y GFP

I.4 Calidad del agua

Las soluciones, reactivos y medios de cultivo fueron preparados con agua deionizada de calidad ultrapura, con resistividad específica de 18 ΩM.

I.5 Esterilización de materiales y soluciones

El material empleado para cultivos celulares y PCR fue esterilizado por calor seco (160-170 °C, 90 min), por calor húmedo (121 °C, 1 atm, 30 min) o por radiación gamma, de acuerdo con las características del mismo. Las soluciones termolábiles, tales como medios de cultivo, fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana de acetato de celulosa, con poros de 0,22 μm (Millipore), empleando presión positiva de nitrógeno.

I.6 Higiene y seguridad en el manejo de residuos peligrosos y patogénicos

El descarte de residuos peligrosos y patogénicos, así como el de soluciones peligrosas fue realizado de acuerdo con los requerimientos del Servicio de Seguridad e Higiene de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

II. Cultivos celulares

Todas las líneas fueron mantenidas en estufa de cultivo a 37 °C, en una atmósfera con CO₂ 5%, con cambio del medio de cultivo cada dos días.

II.1 Células endoteliales

✦ Células HUVEC (C-003-5C; Life Technologies)

Las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) son ampliamente utilizadas como modelo de endotelio macrovascular. Por tratarse de un cultivo primario, se empleó para su crecimiento el medio basal de cultivo M199 suplementado con una mezcla de factores de crecimiento reducido en suero (*Low Serum Growth Supplement kit*, S-003-K, Gibco, **Tabla I**). Las células fueron utilizadas entre los pasajes 2 y 5, debido a la senescencia de los cultivos.

Componente LSGS kit	Concentración final
Hidrocortisona	1 µg/mL
EGF (<i>Epidermal Growth Factor</i>)	10 ng/mL
bFGF (<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>)	3 ng/mL
Heparina	10 µg/mL
Albúmina sérica bovina	0,2 µg/mL
Gentamicina/anfotericina	1X
Suero fetal bovino	2% (v/v)

Tabla I. Componentes del kit de factores de crecimiento LSGS (Gibco) empleado para el cultivo de células HUVEC.

✦ Células EA.hy926 (ATCC CRL-2922)

Obtenidas por gentileza de la Dra. Fernanda Parborell (IBYME-CONICET, Buenos Aires) con permiso del Dr. Gareth Owen (Pontificia Universidad Católica, Chile).

Línea celular endotelial immortalizada obtenida a partir de células HUVEC de pasaje 1 y células de la línea A549 de adenocarcinoma pulmonar humano, mediante un protocolo de fusión con polietilenglicol (Edgell et al., 1983). Esta línea celular presenta una morfología típicamente endotelial (**Figura I**), adquiriendo una apariencia de empedrado al llegar a confluencia, y es estable en su expresión de antígenos, lo que la convierte en la línea celular de elección para el estudio del endotelio macrovascular humano (Bouïs et al., 2001).

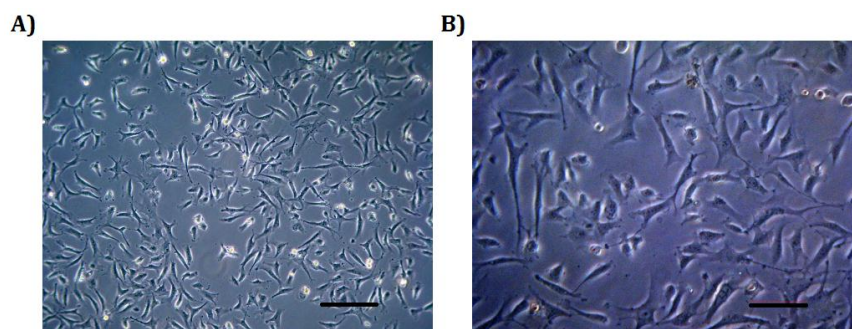


Figura I. Células EA.hy926. Fotografías obtenidas por microscopía de contraste de fase. Las imágenes fueron tomadas a diferentes magnificaciones. **A)** Magnificación 100X, la barra negra representa 200 µm. **B)** Magnificación 400X, la barra negra representa 50 µm.

Por otro lado, su fenotipo endotelial ha sido demostrado en diversas publicaciones (**Tabla II**).

Característica fenotípica	Referencia
Expresión de endotelina-1 y susceptibilidad a reguladores de ET-1	<i>Saijonmaa 1991</i>
Cuerpos de Weibel-Palade	<i>Edgell 1990</i>
Expresión de prostaciclina	<i>Suggs 1986</i>
Expresión de antígeno relacionado al factor VIII	<i>Edgell 1983</i>
Adhesión leucocitaria y expresión de moléculas de adhesión endotelial ICAM-1 y VCAM-1 en presencia de TNF	<i>Thornhill 1993</i>
Capacidad tubulogénica en sustrato similar matriz extracelular	<i>Bauer 1992</i>
Capacidad fibrinolítica	<i>Emeis and Edgell 1988</i>

Tabla II. Características fenotípicas endoteliales de la línea celular EA.hy926 publicadas en la literatura.

La elección de la línea celular EA.hy926 como modelo experimental se debe a una mayor estabilidad a través de los pasajes con respecto a las células HUVEC, y a una mayor reproducibilidad de los resultados. Sin embargo, con el fin de corroborar los resultados obtenidos en esta línea celular, se realizaron ensayos paralelos en células HUVEC.

Las células fueron mantenidas en medio IMDM suplementado con suero fetal bovino inactivado (SFB, 10% v/v), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Los cultivos fueron utilizados hasta el pasaje 18, debido a la senescencia celular.

✦ Células HMEC-1 (ATCC CRL-3243)

La línea celular HMEC-1 (*Human Microvascular Endothelial Cells*) fue obtenida a partir de células endoteliales de la microvasculatura dérmica humana inmortalizadas por transfección del vector pSVT (un plásmido con base pBR-322 conteniendo la región codificante del producto del gen SV40A, Simian Virus 10 A). Desde su caracterización, han sido ampliamente utilizadas como

modelo de endotelio microvascular, ya que retienen muchas de las características de las células endoteliales (Ades et al., 1992).

Los cultivos fueron mantenidos en medio RPMI-1640 suplementado con hidrocortisona (1 µg/mL), factor de crecimiento epidérmico (EGF, 10 ng/mL), L-glutamina (10 mM), penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL), y SFB (10% v/v). Los cultivos de células HMEC-1 no fueron utilizados más allá del pasaje 30 debido a la entrada de las mismas en senescencia.

Reproducción del estado de quiescencia en células endoteliales

En ausencia de estímulos proangiogénicos, el endotelio se encuentra mayormente en un estado de *quiescencia* o *latencia*, coincidente con la fase G0 del ciclo celular. Si bien esta etapa se caracteriza por un arresto mitótico, las células endoteliales pueden cambiar a un fenotipo proliferativo en caso de injuria vascular o hipoxia, situaciones donde se requiere de la angiogénesis. Para inducir el estado de quiescencia celular, se realizó una preincubación de los cultivos con medio M199 (HUVEC), IMDM (EA.hy926) o RPMI-1640 (HMEC-1) en ausencia de SFB antes de llevar a cabo los experimentos.

II.2 Células no endoteliales

✦ Células UT-7

Donadas gentilmente por el Dr. Patrick Mayeux (Cochin Hospital, France).

Línea celular establecida a partir de médula ósea de un paciente con leucemia mieloide aguda (Komatsu et al., 1991), dependiente de eritropoyetina para su supervivencia y capaz de comprometerse al linaje eritroide. Los cultivos fueron mantenidos a una densidad de 150.000 células/mL en medio IMDM suplementado con SFB (10% v/v), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y rHuEpo (Hemax®, Biosidus, Argentina) (16 ng/mL, correspondientes a 2 U/mL).

✦ Células SH-SY5Y (ATCC CRL-2256)

Sublínea de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH. Los cultivos fueron mantenidos en un medio compuesto por DMEM y Ham's F-12 (en relación 1:1) suplementado con L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y SFB (10% v/v).

II.3 Disociación de células adherentes y subcultivo

Para la disociación y recolección de células adherentes se empleó el reactivo TrypLe Express 1X (Gibco). El mismo contiene EDTA y una enzima recombinante alternativa a la tripsina

(*rProtease*). Las monocapas celulares a recolectar fueron incubadas durante 5-10 min con este reactivo en relación 50-60 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de superficie de cultivo. La suspensión celular resultante fue diluida a un tercio con medio de cultivo con 10% SFB, trasvasada a un tubo cónico y posteriormente centrifugada durante 5 min a 100 xg. Al llegar al 80-90% de confluencia, las células adherentes fueron subcultivadas según la relación:

1 botella de 25 cm³ (T25) de pasaje “n” → 3 botellas T25 de pasaje “n+1”

II.4 Criopreservación de líneas celulares

II.4.1 Congelamiento de células

Para evitar la lisis celular debida a la formación de masas de hielo en el citoplasma durante el congelamiento, se empleó un protocolo de congelamiento lento. Este protocolo permite la formación de hielo en el medio de resuspensión, con lo cual las concentraciones de sales, azúcares y del compuesto crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) aumentan en el escaso volumen aún no congelado (fracción no congelada) en el que se encuentran las células. El aumento de la fuerza iónica produce la salida de agua de las células, minimizando la posibilidad de formación de hielo en su interior. Mientras el congelamiento continúa, la viscosidad de la fracción no congelada aumenta lo suficiente para no permitir cristalización, protegiendo a las células.

Las células fueron recolectadas de la manera usual, centrifugadas y resuspendidas en una mezcla anticongelante compuesta por DMSO 10% en SFB, siguiendo la relación:

1 botella T25 confluyente → 1 mL de mezcla anticongelante → 1 criovial

Con el fin de lograr un congelamiento lento (a una velocidad de refrigeración de, aproximadamente, 1 °C/min), los viales fueron colocados en un recipiente Mr. Frosty (Nalgene) cargado de alcohol isopropílico a temperatura ambiente, y conservadas a -20 °C durante 2 h, para luego ser colocadas a -70 °C durante al menos 24 h. Los crioviales fueron mantenidos en nitrógeno líquido.

II.4.2 Descongelamiento de células

A diferencia del congelamiento, el descongelamiento de células debe realizarse rápidamente a causa de la toxicidad del DMSO. Una vez retirados del nitrógeno líquido, los crioviales fueron sumergidos parcialmente en agua a 37 °C hasta su descongelamiento. El contenido (1 mL) fue diluido con 9 mL del correspondiente medio de cultivo completo, y centrifugado para eliminar el DMSO. Los *pellets* celulares fueron resuspendidos en medio de cultivo completo y distribuidos según las siguientes relaciones:

🚦 HUVEC, EA.hy926 y HMEC-1: 1 vial → 3 botellas T25 ó 1 T75

🚦 SH-SY5Y y UT-7: 1 vial → 1 T25

En todos los casos, el medio de cultivo fue cambiado a las 24 h para eliminar restos de DMSO.

III. Protocolos

III.1 Estudio de proliferación, viabilidad y ciclo celular

III.1.1 Proliferación y viabilidad de células EA.hy926 por recuento en cámara de Neubauer con azul Tripán

Para el estudio de la proliferación de células EA.hy926 en respuesta a Epo o cEpo se sembraron 30.000 células/*well* en placa de 24 *wells* y se las incubó a 37 °C durante 18 h en medio IMDM completo para favorecer su adhesión. Posteriormente se realizó un lavado con *buffer* fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) y se las incubó por 8 h en medio IMDM sin SFB, con el fin de inducir la quiescencia celular. Los tratamientos se agregaron en medio sin SFB. Al cabo de la incubación con los correspondientes tratamientos (durante 15, 24 ó 48 h), las células fueron recolectadas con TrypLE (Gibco), lavadas con PBS y resuspendidas en medio IMDM sin SFB.

Para cada tratamiento, los recuentos en cámara de Neubauer se realizaron al menos por triplicado, diluyendo la suspensión celular en relación 1:1 con el colorante vital azul Tripán (preparado al 50% en PBS). El citosol de las células no viables se colorea de azul debido a la pérdida de integridad de la membrana plasmática.

III.1.2 Ciclo celular por citometría de flujo

Al finalizar los tratamientos, las células fueron recolectadas con TrypLE y lavadas con PBS frío. Todos los pasos posteriores fueron realizados manteniendo las muestras en hielo. Los *pellets* celulares fueron resuspendidos en PBS y fijados agregando etanol absoluto frío lentamente, alternando con agitación suave en vórtex, hasta una concentración final de 70% (v/v). Las muestras fueron mantenidas por no menos de 24 h a -20 °C, luego centrifugadas y resuspendidas nuevamente en PBS. Seguidamente se las incubó durante 1 h a 37 °C con ribonucleasa A (120 µg/mL), a fin de eliminar el ARN contaminante, y yoduro de propidio (0,05 mg/mL), un agente intercalante que permite marcar ADN. Al cabo de la incubación, las muestras fueron diluidas con PBS frío y filtradas a través de tela *voile* para eliminar agregados de células. Las suspensiones celulares se mantuvieron en hielo hasta la adquisición de eventos por citometría de flujo.

Para el análisis de los resultados se empleó la aplicación de ciclo celular del software FloJo (FloJo LLC), que detecta automáticamente las poblaciones correspondientes a las fases G0/G1, S y G2

del ciclo celular. Se aplicaron restricciones al contenido de ADN de las fases (ADN fase G2 = 2 x ADN fase G0/G1) y a los coeficientes de variación de las poblaciones (CV fase G0/G1 = CV fase G2).

III.2 Ensayos de migración y angiogénesis

III.2.1 Ensayo de *wound healing*

Sobre una placa de 24 *wells* se sembraron 65.000 células/well y se las incubó durante 24 h a 37 °C en medio de cultivo completo para permitir su pegado a la placa y su estabilización. Tras dos lavados con PBS estéril para eliminar restos de suero, se las incubó durante 8 h en medio IMDM en ausencia de SFB, a fin de inducir un estado de quiescencia (arresto celular). Posteriormente, se practicó en cada *well* una herida en forma de cruz con un *tip* de micropipeta, se realizó un nuevo lavado y se procedió a agregar los diferentes tratamientos en medio de cultivo sin SFB. Como control positivo de migración celular se empleó SFB 10%, obteniendo una respuesta migratoria máxima, mientras que a modo de control negativo se midió la migración basal en medio de cultivo sin SFB.

La migración se evaluó siguiendo el tamaño de la herida mediante fotografías tomadas con el microscopio invertido Axiovert 135 (Carl Zeiss) al momento de realizar la herida y 15 h (EA.hy926, HMEC-1) o 24 h (HUVEC) más tarde. El tiempo de migración empleado fue el menor tiempo de incubación que permitiese detectar diferencias entre tratamientos, por debajo del tiempo de duplicación del tipo celular en estudio, a fin de excluir del análisis un posible efecto de cierre de la herida atribuible a proliferación. Las fotografías fueron digitalizadas y analizadas mediante el *software* Axiovision (Carl Zeiss).

Los resultados se analizaron midiendo el ancho de la herida a tiempo inicial y final en diferentes puntos de cada *well*, que fueron promediados. La migración celular se expresó como el porcentaje de la herida repoblada con respecto al tamaño original. Éste fue calculado:

$$\text{Migración celular (\%)} = 100\% (\text{herida inicial}) - (\text{tamaño final} * 100 / \text{tamaño inicial})$$

siendo el último término el porcentaje de la herida no repoblada en relación al tamaño inicial.

III.2.2 Ensayo de formación de túbulos sobre sustrato similar matriz extracelular

El ensayo de formación de túbulos sobre un extracto de membrana basal es el método de elección para el estudio de la angiogénesis *in vitro* (Arnautova et al., 2009). Se basa en la capacidad de las células endoteliales de formar estructuras tubulares similares a vasos sanguíneos en cultivos tridimensionales, mantenidos en una matriz Geltrex (Gibco) reducida en factores de crecimiento. Este producto es un extracto de membrana basal obtenido a partir de

tumores murinos Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), abundante en laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicanos de sulfato de heparina.

Para los experimentos realizados en células EA.hy926 se prepararon *wells* para placa de 96 con 50 µL de Geltrex sin diluir descongelado en el momento. La matriz se dejó gelificar en estufa de cultivo a 37 °C durante 2-3 h. Tras la gelificación de la matriz, se sembraron en cada *well* 15.000 células EA.hy926 previamente deprivadas de SFB durante 18 h, junto con sus correspondientes tratamientos, en un volumen final de 200 µL.

Para el análisis de las estructuras tubulares se empleó el método desarrollado por Aranda y Owen (2006), que permite comparar la capacidad angiogénica de dos o más compuestos mediante el cálculo de un índice angiogénico (I.A.), que se detalla en la **Ecuación I**.

$$\text{Índice angiogénico} = \left[\frac{\text{nº de céls en sprouting} + (\text{nº de céls conectadas})^2 + (\text{nº de polígonos})^3}{\text{nº total de céls}} \right] + (0, 1 + \text{ó } 2)$$

Ecuación I. Índice angiogénico desarrollado por Aranda y Owen (2006). En la etapa de *sprouting*, las células están adheridas a la matriz pero aún no se han conectado entre sí. Al valor obtenido mediante el cálculo entre corchetes se suma 1 si se observa un entramado de 2-3 células y 2 si presenta un espesor de 4 ó más células.

Esta metodología supone una ventaja con respecto a otras formas de cuantificar la tubulogénesis, ya que su cálculo asigna un valor a cada etapa del proceso de formación de túbulos, permitiendo así detectar incluso pequeñas diferencias de potencial angiogénico entre diversos compuestos. El análisis del experimento se realizó a partir de fotografías tomadas a magnificación 400X tras 24 h de incubación con los correspondientes tratamientos. El recuento y clasificación de las células se realizó en forma manual. El índice angiogénico obtenido para cada tratamiento en cada experimento independiente fue el promedio de los índices calculados en 10 fotografías tomadas del mismo *well*.

Es importante mencionar que en cada experimento se incubaron células en medio IMDM sin SFB como control basal de formación de túbulos. Por otro lado, como control positivo de angiogénesis se empleó SFB 2% (Gibco). La concentración óptima de suero se evaluó mediante una curva de concentraciones, a partir de la cual se determinó que concentraciones de SFB mayores a 2% inhiben la formación de estructuras tubulares (**Figura II**). El efecto inhibitorio observado podría deberse a que una mayor cantidad de suero en el medio de incubación implica, además de concentraciones más elevadas de compuestos estimulantes de la formación de túbulos, un aumento en la concentración de factores que inhiben este proceso, y cuya actividad sólo puede ser observada en estas condiciones.

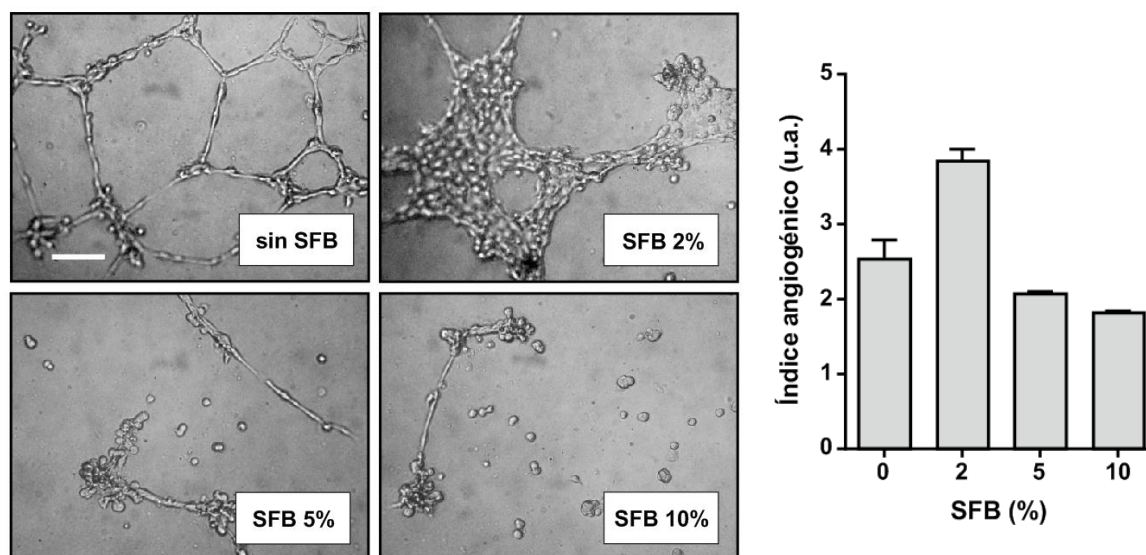


Figura II. Optimización del ensayo de tubulogénesis sobre sustrato símil matriz extracelular. Se evaluó la formación de túbulos de células EA.hy926 sobre Geltrex en respuesta a diferentes concentraciones de suero fetal bovino (Gibco). Las barras muestran media $\pm$ SEM del índice angiogénico (I.A.) calculado ($n=2$). Se incluyen fotografías representativas de los diferentes tratamientos. La línea blanca representa 100 μ m.

III.3 Inhibidores empleados

- ✦ **AG490 (tirfostina):** inhibidor de JAK2, la tirosina kinasa asociada al receptor de Epo.
- ✦ **Bloqueantes de canales de calcio dependientes de voltaje (Figura III):**
 - **Amlodipina:** La amlodipina (en su forma besilato de amlodipina), perteneciente a la familia de las dihidropiridinas, es un bloqueante de canales de calcio de tipo L (dependientes de voltaje). Este compuesto inhibe canales de calcio del miocardio y de la musculatura lisa vascular.
 - **Diltiazem:** El diltiazem es un antagonista de calcio de la familia de las benzodiazepinas, que bloquea canales de calcio dependientes de voltaje con mayor actividad en miocardio que las dihidropiridinas. Se lo emplea como antihipertensivo y en el tratamiento de arritmias y *angina pectoris*.

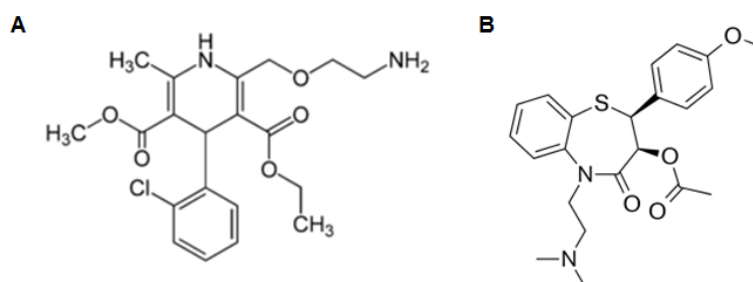


Figura III. Estructura química de los inhibidores de canales de calcio voltaje-dependientes amlodipina (A) y diltiazem (B).

- ✦ **Calpeptina:** Péptido sintético que actúa como inhibidor de calpaína, capaz de atravesar la membrana plasmática celular.
- ✦ **HgCl₂:** El ión Hg²⁺ es un eficaz inhibidor de acuaporinas.
- ✦ **LY294002:** Inhibidor reversible de enzimas fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3Ks).
- ✦ **N-acetilcisteína (NAC):** Derivado N-acetilado de la cisteína. Actúa como *scavenger* de radicales libres, particularmente radicales de oxígeno, lo que le confiere propiedades antioxidantes. En la clínica es empleado como agente mucolítico.
- ✦ **N^G-metil-L-arginina acetato (L-NMMA):** Inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintasa en sus tres isoformas: endotelial (eNOS), inducible (iNOS) y neuronal (nNOS). Es uno de los vasoconstrictores más potentes.
- ✦ **Quinina:** Inhibidor de canales de potasio activables por calcio. Es empleado en la clínica como antipirético, anticonvulsivo, antiinflamatorio, analgésico y antimalárico.

III.4 Electroforesis y Western blotting

III.4.1 Extracción de proteínas

Tras los correspondientes tratamientos, las células fueron lisadas con un *buffer* consistente de Tris-HCl 100 mM pH 6,8 (4% p/v), dodecilsulfato de sodio (SDS, 0,2% p/v), azul de bromofenol y 2-mercaptoetanol (200 mM), calentado a 90 °C, y posteriormente congeladas y vortexeadas en forma repetida. Previo a su siembra en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, las muestras fueron calentadas a 95 °C por 2 min y centrifugadas para precipitar el *debris* celular.

III.4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE) y desnaturizantes (SDS-PAGE).

Para favorecer la resolución de las bandas proteicas a separar se empleó el sistema discontinuo de Laemmli (1970), consistente de un gel separador de tamaño de poro variable de acuerdo con las características de la muestra estudiada (en este caso, T% = 10%), y un gel concentrador de poro no restrictivo (T% = 4%). Como iniciador de la polimerización se empleó persulfato de amonio, y como propagador de la reacción la *N, N, N', N'*-tetrametiletildiamina (TEMED).

Para los geles en condiciones desnaturizantes se empleó el detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS). Este compuesto se une a las proteínas equiparando la densidad de carga superficial de las mismas, por lo que, empleando geles con tamaño de poro selectivo, la separación electroforética de las proteínas se relaciona con las diferencias entre sus tamaños moleculares. En la **Tabla III** se detallan las concentraciones de los reactivos componentes de los geles concentrador y separador.

Reactivo	Gel concentrador (T=4%)	Gel separador (T=10%)
Solución madre acrilamida/ N'N'-metilenbisacrilamida (37,5:1)	acrilamida 39 g/L; bisacrilamida 1 g/L	acrilamida 97,5 g/L; bisacrilamida 2,5 g/L
Buffer gel concentrador (Tris 0,5 M-HCl, pH 6,8)	0,125 M Tris-HCl, pH 6,8	-
Buffer gel separador (Tris 3 M-HCl, pH 8,8)	-	0,375 M Tris-HCl pH 8,8
SDS (sólo en geles desnaturalizantes)	0,1%	0,1%
Persulfato de amonio	0,05% (p/v)	0,05% (p/v)
TEMED (N,N,N,N-tetrametilendiamina)	0,05% (v/v)	0,05% (v/v)

Tabla III. Concentraciones finales de los reactivos empleados para la preparación de geles de poliacrilamida. Se detallan los componentes de los geles concentrador y separador del sistema discontinuo, tanto nativos como desnaturalizantes (con SDS).

Para las electroforesis en condiciones nativas se agregó una mezcla de sacarosa (5-10% p/v) y azul de bromofenol a la muestra proteica a fin de proporcionar mayor densidad y facilitar la siembra en las calles del gel. En el caso de electroforesis desnaturalizante, las muestras fueron pretratadas con un *buffer* de siembra 4x en relación 3:1, de forma tal que las concentraciones finales de los componentes del *buffer* fueron: Tris-HCl 0,625 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,001% y 2-mercaptoetanol 5%. Además, las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento a 100 °C durante 4 min (*cracking*). En cada calle del gel se sembró una masa determinada de proteínas totales. Además de las muestras, en una de las calles se sembró un marcador de pesos moleculares precoloreado (Fermentas).

Para el desarrollo electroforético se emplearon cubas Hoefer Mighty Small II (Amersham Biosciences) o Miniprotean III (BioRad). El *buffer* empleado en los reservorios electródicos consistió de Tris 0,025 M y glicina 0,192 M, con el agregado de SDS 0,1% en los desarrollos de SDS-PAGE. Las electroforesis fueron desarrolladas a corriente constante de 20 mA durante el proceso de isotacoforesis en el gel concentrador y de 25 mA durante el desarrollo electroforético en el gel separador.

III.4.3 Electrotransferencia de proteínas

Una vez finalizado el desarrollo electroforético, las proteínas separadas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa para su posterior detección con anticuerpos específicos. La nitrocelulosa se caracteriza por su alta afinidad a proteínas y por su capacidad de inmovilizarlas mediante interacciones hidrofóbicas. Previo a la electrotransferencia, los geles y las membranas de nitrocelulosa fueron hidratados con *buffer de transferencia* (Tris 25 mM; glicina 195 mM; SDS 0,05%, pH 8,3; metanol 20%, v/v) durante 30

min. La electrotransferencia se desarrolló durante 1 h 15 min a 100 V constantes y amperaje inicial de 350 mA.

III.4.4 Western blotting

Al finalizar la transferencia, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas (3 x 10 min) con *buffer* TBS (*Tris-Buffered Saline*, Tris 25 mM; NaCl 137 mM; KCl 3 mM; pH 7,4) conteniendo Tween-20 0,1% (TBS-T). Antes de la incubación con anticuerpos primarios se realizó un bloqueo de los sitios de unión inespecíficos incubando las membranas con leche descremada 5% (p/v) en TBS-T durante 1 h en agitación. La incubación de las membranas con los anticuerpos primarios diluidos en TBS-T se realizó durante toda la noche a 4 °C. Tras retirar los anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas con TBS-T (3 x 10 min) e incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa de rabanito (*horseradish peroxidase*, HRP) (dilución 1:3000 en TBS-T), durante 1 h en agitación.

Tras realizar los últimos lavados de las membranas con TBS-T (3 x 10 min), se procedió al revelado de las bandas proteicas por quimioluminiscencia, en un equipo G:BOX (Syngene) acoplado a una cámara digital. El revelado consiste en la oxidación de luminol, catalizada por peroxidasa, en presencia de H₂O₂. El compuesto resultante se encuentra en un estado excitado que emite luz al volver a su estado basal.

La cuantificación de los niveles de proteína se realizó mediante densitometría de bandas, empleando el *software* ImageJ. Para ello, se midió la densidad de la banda correspondiente a cada tratamiento y se la relativizó en función de la densidad de banda del control de siembra β -actina del mismo tratamiento.

III.5 Cuantificación de los niveles de ARN mensajero

III.5.1 Extracción y purificación de ARN total

La obtención de ARN a partir de cultivos celulares se realizó mediante extracción orgánica seguida de precipitación alcohólica y rehidratación. Durante este protocolo, al igual que durante la preparación de las PCR, se evitó la contaminación de las muestras y la degradación de las mismas empleando reactivos y material plástico libres de ARNsas y ADNsas y trabajando en cabina para uso exclusivo de PCR con material limpio.

El protocolo de extracción y purificación de ARN consta de los siguientes pasos:

1. Extracción orgánica

- Lisis celular y extracción en fenol (TRIzol®, Life Technologies)/cloroformo, con obtención de tres fases:
 - ♦ *Fase superior acuosa, clara*: ARN en solución
 - ♦ *Interfase, color blanquecino*: ADN precipitado y proteínas desnaturalizadas
 - ♦ *Fase inferior orgánica, de color rosado*: proteínas

2. Precipitación alcohólica (a partir de la fase acuosa obtenida en el paso anterior)

- Resuspensión en alcohol isopropílico
- Lavado con etanol 75% en agua DEPC

3. Rehidratación en agua DEPC e incubación a 55-60 °C por 10 min**4. Cuantificación por absorbancia a 260 nm**

- Absorbancia a 260 nm (NanoDrop 2000, Thermofisher Scientific). Como criterio de calidad de las muestras se tomó un rango de valores entre 1,8 y 2,0 para el cociente 260/280 nm (indicador de contaminación proteica y degradación del ARN), y de aproximadamente 0,5 para la relación 230/260 nm (indicador de contaminación por fenoles).

III.5.2 Pasaje a ADNc

A partir de 1 µg de ARN total, se realizó el pasaje a ADN complementario (ADNc) empleando la enzima transcriptasa reversa del Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV), en presencia del inhibidor de RNAsas RNasin y oligoDTs (Promega Corporation), en un volumen final de reacción de 20 µL (dilución original). El pasaje a ADNc se realizó en un termociclador Eppendorf (Mastercycler gradient) y consistió en una etapa de 60 min a 42 °C seguida de 10 min a 94 °C.

III.5.3 Amplificación del ADNc de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR)**✦ RT-PCR de punto final (endpoint RT-PCR)**

La RT-PCR de punto final se realizó a partir de 1-3 µL de ADNc (dilución original) que fueron llevados a un volumen final de 25 µL con una mezcla madre (*master mix*). La misma consistió de *buffer* de la enzima (1X), Mg²⁺ (3 mM), dNTPs (0,2 µM), los correspondientes *primers* (0,25 µM) (**Tabla IV**) y la enzima Taq polimerasa (2,5 U/mL).

Como control interno de amplificación y de carga, en cada experimento se amplificó, junto al ARNm de interés, el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), un gen de *housekeeping*. Como control negativo se incluyó un tubo con la *master mix* correspondiente pero sin muestra de ADNc. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf (Mastercycler gradient) en la condiciones descritas en la **Tabla V**.

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Pb	Temp.
EpoR	TGGTATCTGACTCTGGCAT	TCCCTGATCATCTGCAGCC	181	64 °C
βcR	GGACAGCAAGACCGAGAC	CATAGGCAGCACCGACTC	175	55 °C
AQP-1	TGCCATCGGCCTCTCTGTAG	AAGGACCGAGCAGGGTTAATC	81	56 °C
TNFR1	TCGATTTGCTGTACCAAGTG	GAAATGACCAGGGGCAACAG	492	53 °C
GAPDH	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT	240	-

Tabla IV. Secuencias, longitud del fragmento amplificado y temperaturas de apareamiento de los primers utilizados. Dado que GAPDH fue empleado como control interno, la temperatura de apareamiento (*annealing*) fue la misma que la del gen de interés en cada experimento. Pb: pares de bases.

Etapas	Tiempo EpoR, βcR y AQP-1	Tiempo TNFR1	Temperatura (°C)	Repeticiones
Desnaturalización	5 min	5 min	94	x 1
Amplificación	30 s	1 min	94	x 35
Apareamiento (<i>annealing</i>)	30 s	2 min	(ver Primers Tabla IV)	
Extensión	30 s	2 min	72	
Extensión final	10 min	10 min	72	x 1

Tabla V. Condiciones de amplificación empleadas para primers de EpoR, βcR, AQP-1 y TNFR1 por PCR de punto final.

✦ *Electroforesis en gel de agarosa y revelado*

Los productos de RT-PCR fueron sembrados en geles de agarosa (2 a 3%) teñidos con el agente intercalante bromuro de etidio (0,5%). Cada producto de PCR (10 µL) fue mezclado con 2 µL de *buffer* de siembra consistente de azul de bromofenol (0,25% p/v) y sacarosa (4% p/v) en *buffer* TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) y sembrado en el gel. Además de las muestras, se sembró un marcador de pares de bases como control del tamaño de los fragmentos amplificados y un control negativo de reactivos. El desarrollo electroforético se realizó en *buffer* TAE frío, a 280 V durante 18-20 min en una cuba electroforética Liberty 2. La fluorescencia del bromuro de etidio fue detectada en un sistema G:BOX Chemi y digitalizada con el software GeneSys. La cuantificación de los niveles de ARNm se realizó por densitometría de bandas, normalizando los datos del gen de interés con los del estándar interno GAPDH con el *software* ImageJ.

✦ *RT-PCR en tiempo real (real-time RT-PCR) de AQP-1*

Esta técnica permite recolectar información de la muestra en forma simultánea a la amplificación del gen de interés. La RT-PCR en tiempo real se realizó a partir de 5 µL de ADNc (dilución 1:4) y 20 µL de *master mix*. Las concentraciones finales de los componentes de la mezcla de reacción fueron las mismas que en la RT-PCR de punto final, a excepción de la Taq polimerasa (concentración final: 8 U/mL), y del agregado de SYBR Green (1:100), un compuesto intercalante que fluoresce en presencia de ADN doble cadena. Se incluyeron un control negativo

de amplificación en ausencia de ADNc, y un control interno de amplificación del ARNm de GAPDH. La RT-PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad iCycler iQ5 (**Tabla VI**) y los resultados fueron analizados con el programa BioRad CFX Manager.

La cuantificación relativa de resultados se realizó por el método $\Delta\Delta C_t$, mediante el cual los valores de C_t del gen de interés (en este caso AQP-1) de los tratamientos experimentales son relativizados en función del C_t obtenido en el grupo Control y de un gen normalizador (GAPDH). Los valores resultantes ($\Delta\Delta C_t$) para cada tratamiento son posteriormente relativizados al $\Delta\Delta C_t$ del grupo control, obteniendo la expresión relativa (*fold difference*), como se aprecia en la

Ecuación II:

Etapa	Tiempo	Temperatura (°C)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	10 min	95	x 1
{ Amplificación Annealing Extensión	30 s	95	} x 40
	30 s	56	
	30 s	72	

Tabla VI. Programa de amplificación de AQP-1 mediante *real-time* RT-PCR. Se detalla la duración y la temperatura de las diferentes etapas.

$$\begin{aligned}
 C_t \text{ AQP-1} - C_t \text{ GAPDH} &= \Delta C_t \text{ Control} \\
 C_t \text{ AQP-1} - C_t \text{ GAPDH} &= \Delta C_t \text{ tratamiento} \\
 \Delta C_t \text{ Tratamiento} - \Delta C_t \text{ Control} &= \Delta\Delta C_t \\
 \text{Expresión relativa (fold difference)} &= 2^{-\Delta\Delta C_t}
 \end{aligned}$$

Ecuación II. Método de cuantificación relativa para *real-time* RT-PCR (método $\Delta\Delta C_t$).

III.6 Silenciamiento de AQP-1 y de EpoR mediante interferencia por ARN

Con el objeto de disminuir los niveles de expresión de AQP-1 y EpoR en células endoteliales se realizó un silenciamiento a nivel post-transcripcional empleando la técnica de interferencia por ARN. La misma hace uso de un mecanismo celular endógeno de defensa contra patógenos, mediante el cual los ARNm extraños son clivados impidiendo su traducción. Los ARN de doble cadena (*double strand RNA*, dsRNA) provenientes de movilización de trasposones, replicación viral o introducción artificial son procesados en citoplasma por la enzima Dicer, que los clivando origen a pequeños fragmentos de ARN doble cadena de 21 pb, denominados siRNAs (*small interfering RNAs*). Las hebras de sentido 3' $\rightarrow$ 5' (llamadas *sense strands*) son incorporadas al complejo proteico formado por la enzima RISC, que las emplea como molde para el clivaje específico de ARN mensajeros blanco que contengan dicha secuencia (**Figura IV**).

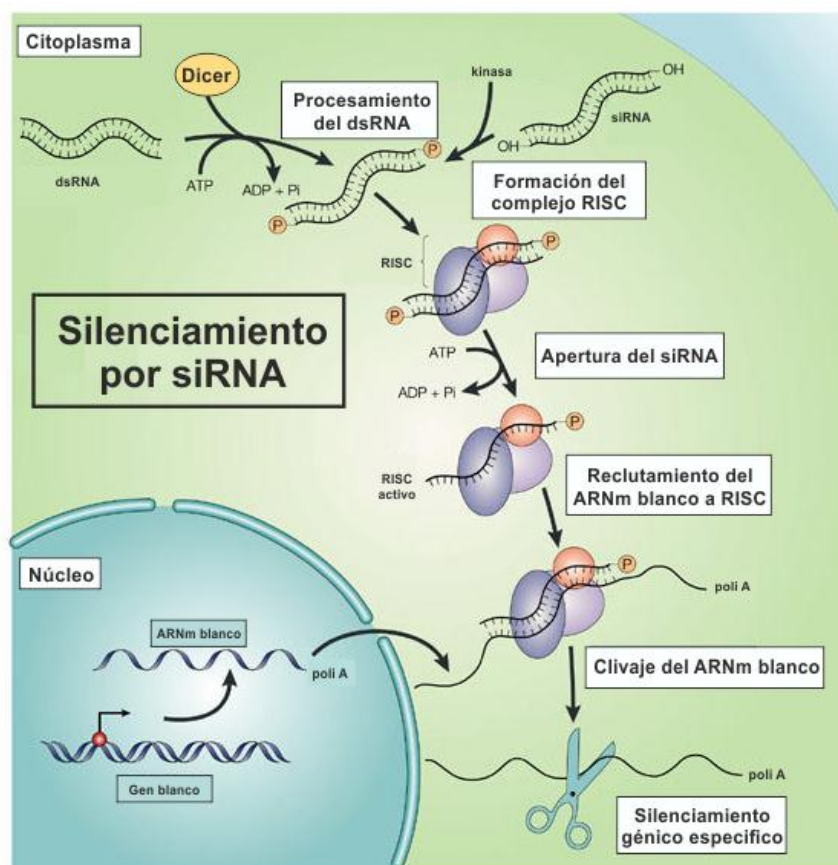


Figura IV. Mecanismo de interferencia por ARN. La enzima Dicer cliva el dsARN (ARN doble cadena) en fragmentos de 21 pb (siRNAs), que son incorporados al complejo RISC. Allí, la hebra 3'→5' es tomada como molde para la degradación específica de ARN mensajeros blanco. Imagen adaptada de Stevenson (2003).

Para el silenciamiento de AQP-1 en células EA.hy926 se empleó un par de siRNAs específicos (Monzani et al., 2009; Gao et al., 2011), cuya hebra sentido presenta la secuencia 5'-AAUGACCUGGCUGAUGGUGUGAACU-3' y cuya hebra antisentido tiene la secuencia 5'-AGUUCACACCAUCAGCCAGGUCAUU-3'. Para el silenciamiento de EpoR en células EA.hy926 se empleó un pool de tres siRNAs específicos disponibles comercialmente (Santa Cruz Biotechnologies, sc-37092). En ambos casos, el par de oligonucleótidos fue introducido en el citoplasma mediante el reactivo Lipofectamina 3000.

Para optimizar el silenciamiento de AQP-1 se realizaron ensayos preliminares con dos concentraciones de siRNA (100 y 200 nM) a tiempos de incubación de 24 y 48 h, con posterior marcación de las células transfectadas con anticuerpo primario anti-AQP-1 para análisis de la expresión proteica por citometría de flujo. Como se observa en la **Figura V**, el silenciamiento fue más efectivo a las 48 h, alcanzando niveles mínimos a una concentración de 100 μ M.

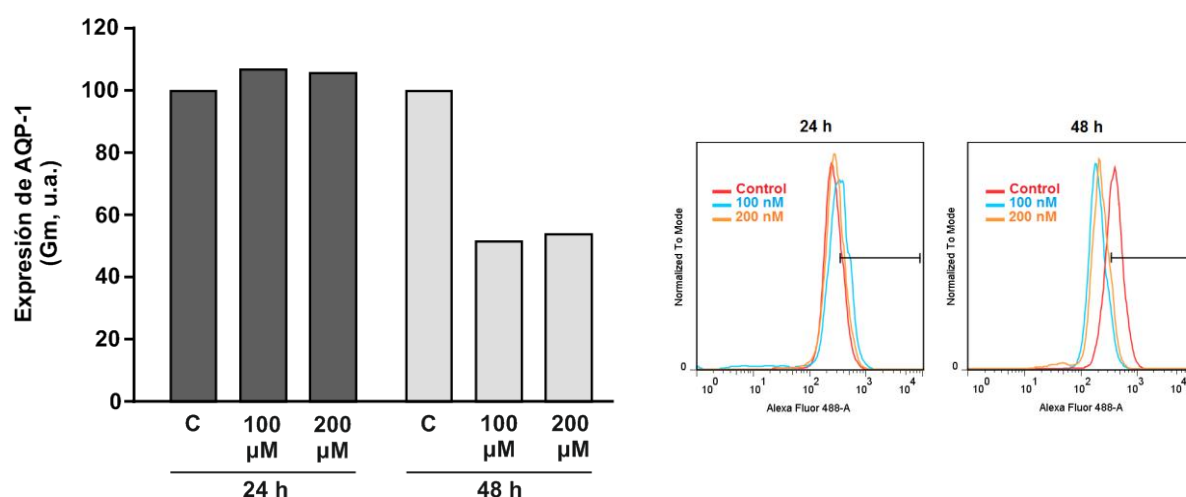


Figura V. Optimización del ensayo de silenciamiento de AQP-1 por ARN interferente (siRNA). Expresión a nivel de proteína de AQP-1 en células EA.hy926 transfectadas con 100 o 200 μM de siRNA durante 24 y 48 h.

En el caso de EpoR, también se probaron dos cantidades de siRNA (25 y 50 picomoles, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante) en un volumen final de 500 μL, a tiempos de incubación de 24 y 48 h, con posterior análisis de la expresión proteica de EpoR por *Western blotting*. Como se observa en la **Figura VI**, el silenciamiento fue más efectivo a las 48 h, alcanzando niveles mínimos con 50 pmoles de siRNA.

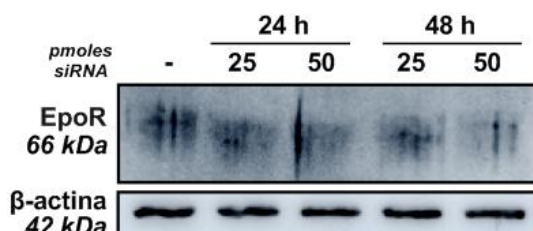


Figura VI. Optimización del ensayo de silenciamiento de EpoR por ARN interferente (siRNA). Expresión a nivel de proteína de EpoR en células EA.hy926 transfectadas con 25 o 50 picomoles de siRNA, evaluada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida seguida de *Western blotting*. A modo de control de siembra se empleó β-actina.

Para los ensayos de *wound healing* con células previamente tratadas con siRNA de AQP-1 o EpoR, se sembraron 40.000 células/*well* en placa de 24 *wells* y se las incubó en medio IMDM completo durante 18 h para permitir su adhesión al sustrato y estabilización. Posteriormente se las deprivó de SFB durante 1 h en medio OptiMEM antes de la transfección.

Para la transfección se preincubaron los siRNAs y la lipofectamina (1 μL) por separado en tubos con 25 μL de OptiMEM, durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se mezclaron los siRNAs con la lipofectamina y se los incubó nuevamente 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregó la mezcla gota a gota sobre los correspondientes *wells*, que ya contenían 450 μL de

OptiMEM. Tras 6 h de incubación a 37 °C, el medio de cultivo se cambió a IMDM con 10% de SFB sin antibióticos. Las células fueron mantenidas en estas condiciones durante 15 - 18 h, para luego realizar el ensayo de migración de la manera explicada anteriormente. Cada experimento de *wound healing* se llevó a cabo en presencia de un control negativo correspondiente al siRNA de la proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) a igual concentración que el siRNA de interés.

III.7 Citometría de flujo

III.7.1 Determinación de antígenos internos y antígenos de membrana con epítopo interno

Las células fueron recolectadas con TrypLE y lavadas con PBS antes de fijar y permeabilizar con Cytofix/Cytoperm (15 min, 4 °C). Tras lavar con *buffer* PermWash 1x (BPW), los receptores FC fueron bloqueados con solución de bloqueo (SFB 10% en BPW) por 10 min a 4 °C. La incubación con anticuerpos primarios (dilución 1:50 en solución de bloqueo) se realizó por 1 h en hielo. Entre los tratamientos se incluyó un control de autofluorescencia (sin anticuerpo primario y sin secundario) y un control de isotipo (marcación con IgG del mismo tipo que el anticuerpo primario). Después del lavado con BPW, las muestras fueron marcadas con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488 ($\lambda_{\text{excitación}}=490\text{nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}=525\text{nm}$) diluido 1:100 en BPW, por 1 h en hielo en oscuridad. Las células fueron lavadas con BPW y resuspendidas en PBS para la adquisición de eventos por citometría de flujo.

III.7.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para la determinación de especies reactivas de oxígeno se empleó la sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Este compuesto penetra en el citosol en su forma reducida (H_2DCFH) no fluorescente. En presencia de agentes oxidantes, la sonda se oxida a su forma fluorescente (DCF), que puede ser detectada por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo ($\lambda_{\text{excitación}}=492\text{--}495\text{nm}$, $\lambda_{\text{emisión}}=517\text{--}527\text{nm}$). La remoción de los grupos acetato por acción de las esterasas intracelulares impide que la sonda pueda difundir hacia el exterior de la célula.

Después de los correspondientes tratamientos, las células fueron lavadas con PBS a temperatura ambiente e incubadas por 30 min at 37 °C con la sonda fluorescente DCFH-DA (20 μM en PBS). Para la adquisición de eventos por citometría de flujo, las monocapas de EA.hy926 fueron recolectadas con TrypLE, centrifugadas y fijadas en PFA 0,5% en PBS. Para microscopía de fluorescencia, en cambio, las monocapas celulares fueron fijadas con PFA 0,5% en PBS y observadas al microscopio invertido.

III.7.3 Determinación de calcio intracelular

Las sondas de calcio intracelular son compuestos cuya intensidad de fluorescencia aumenta al unirse al calcio, con poco cambio en su longitud de onda. La sonda Fluo-4 AM ($\lambda_{\text{excitación}}=494 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}=506 \text{ nm}$) incrementa su intensidad de fluorescencia unas 100 veces al unirse al calcio. La sonda se presenta como un acetometiléster, que una vez desesterificado en el citosol no puede atravesar la membrana plasmática.

Las células EA.hy926 fueron privadas de suero durante 1 h antes de ser incubadas con la sonda Fluo-4 AM (3 μM ; 30 min a 37 °C). Tras la incubación, las monocapas fueron recolectadas con TrypLE, centrifugadas y resuspendidas en *buffer* HEPES (HEPES 20 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 2 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, sacarosa 250 mM) con o sin CaCl_2 1,5 mM. La suspensión celular fue alicuotada en diferentes tubos de citometría y tratada con Epo o cEpo por los tiempos de incubación indicados. En el caso de inhibidores, estos fueron preincubados durante 15 min antes del tratamiento con eritropoyetina. Al finalizar los tiempos de incubación, las células fueron fijadas agregando el volumen correspondiente de una solución de PFA 4% en PBS de forma tal que la concentración final en el tubo de citometría fuese 0,5%.

III.8 Microscopía de fluorescencia y confocal

III.8.1 Inmunomarcación de AQP-1

La marcación de AQP-1 con un anticuerpo específico se realizó en células EA.hy926 sembradas sobre un cubreobjeto con un grado de confluencia entre 70-90%. Los preparados fueron lavados con PBS y fijados con PFA 4% (15 min, 4 °C). Tras dos lavados de 5 min con PBS se procedió a la permeabilización de las células, dado que el anticuerpo anti-AQP-1 presenta un epítipo interno. Para ello se realizó una incubación con *buffer* de permeabilización (Tween 20 0,2%, BSA 0,5% en PBS) durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos nuevos lavados con PBS y seguidamente los cubreobjetos fueron incubados con solución de bloqueo (BSA 2% en PBS) por 30 min a temperatura ambiente. La solución de bloqueo fue retirada y, sin lavar, se realizó la marcación con el anticuerpo primario (diluido 1:25 en solución de bloqueo), colocando 20 μL de la dilución de anticuerpo sobre un portaobjetos limpio y depositando el cubreobjetos encima, con la cara de las células hacia abajo. La incubación se realizó en una cámara húmeda, durante 1 h a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo primario se lavó con PBS (2 x 5 min). La incubación con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (1:100 en BSA 2% en PBS) se realizó en forma idéntica al anticuerpo primario, y fue seguida por dos lavados con PBS previo a montar los preparados con glicerol 50% en PBS.

III.8.2 Marcación nuclear por tinción con Hoechst 33258

El colorante Hoescht 33258 se intercala en el surco menor del ADN doble cadena, preferentemente en regiones ricas en adenina y timina, permitiendo marcar núcleos celulares para microscopía de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}=350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}=461 \text{ nm}$).

Las células fijadas con PFA 4 % y lavadas con PBS fueron incubadas con Hoechst 33258 (0,05 g/L en PBS, 10 min). Las muestras marcadas fueron lavadas con PBS y montadas con glicerol 50% en PBS para ser observadas al microscopio. El recuento de núcleos apoptóticos, distinguibles por su mayor intensidad de fluorescencia y su condensación/fragmentación, se realizó contando 600 núcleos en total por tratamiento por doble ciego.

III.8.3 Marcación de actina filamentosa con faloidina-TRITC

La faloidina es una micotoxina, producida por el hongo *Amanita phalloides*, capaz de unirse a la actina filamentosa (actina F) impidiendo su despolimerización. La faloidina estabiliza monómeros de actina consecutivos, disminuyendo así la tasa de disociación en los extremos del microfilamento.

El protocolo de fijación de las células y bloqueo fue el mismo que se empleó para visualizar AQP-1. Las células fueron incubadas con faloidina conjugada con el fluoróforo tetrametilrodamina (TRITC, $\lambda_{\text{excitación}}=557 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}=576 \text{ nm}$) diluida 1:500 en PBS, durante 20 min a temperatura ambiente. Tras realizar tres lavados con PBS, los preparados fueron montados con glicerol 50% en PBS y luego observados en un microscopio confocal Olympus FV300/Bv61.

III.9 Preparación y caracterización de cEpo

La eritropoyetina carbamilada (cEpo) fue preparada de acuerdo con lo reportado por Leist et al. (2004), con modificaciones. Eritropoyetina recombinante humana Zelltek (Santa Fe, Argentina) (0,3 mg/mL) fue incubada con una solución de cianato de potasio (KCNO) 0,5 M en *buffer* borato de sodio 0,45 M (pH 8,8), a 37 °C durante 48 h. A modo de control, se incubó la misma concentración de Epo Zelltek en *buffer* borato de sodio 0,45 M pH 8,8 en ausencia de KCNO. Para eliminar el cianato residual, tóxico para las células, la preparación fue lavada con cuatro veces el volumen de la muestra de agua 18 mΩ y concentrada por centrifugación en tubos Amicon Ultra-4 Centrifugal Filters (3 kDa *cut-off*; Millipore). Posteriormente, ambas preparaciones fueron esterilizadas por filtración. Por tratarse de una proteína purificada, la concentración final de ambas eritropoyetinas fue estimada por medición de absorbancia a 280 nm en un equipo NanoDrop. De acuerdo con la información facilitada por el proveedor, se tomó en cuenta una actividad específica de Epo de 125 UI/μg. Previamente a su uso en células endoteliales, se realizó

una caracterización química y funcional de la cEpo obtenida, comparándola con la Epo nativa lavada (control de la carbamilación).

III.9.1 Caracterización química de cEpo

✦ *Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE nativo)*

Dado que la carbamilación de Epo altera su carga aparente, la citoquina modificada fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas, donde la movilidad de la proteína depende de su relación carga / masa.

Como se observa en la **Figura VI**, cEpo mostró una mayor movilidad electroforética que la Epo nativa. Esto se debe al enmascaramiento de las cargas positivas de los residuos lisina de la molécula por los grupos cianato, contribuyendo a una carga aparente más negativa.

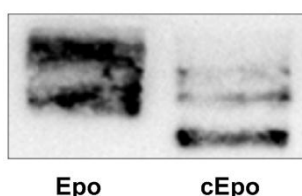


Figura VI. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas y Western blotting de Epo y cEpo. Se sembraron 0,5 µg de Epo nativa y de cEpo en un gel de poliacrilamida nativo (T = 10%). Tras el desarrollo electroforético, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, y posteriormente marcadas con un anticuerpo primario específico contra Epo.

✦ *Electroforesis capilar de zona (ECZ)*

El análisis de las muestras de Epo lavada y de cEpo se realizó en *buffer* borato de sodio 150 mM a pH 9,9 en un equipo P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter), equipado con un detector de arreglo de diodos (*Photo Diode Array*, PDA) y filtro de 214 nm.

La **Figura VII** muestra un electroferograma representativo, en el cual se observa que el enmascaramiento de los residuos lisina producido por la carbamilación provocó un aumento en el tiempo de retención de cEpo con respecto al de Epo, con un desfasaje entre ambas eritropoyetinas de $21,7 \pm 0,1$ s (n=2).

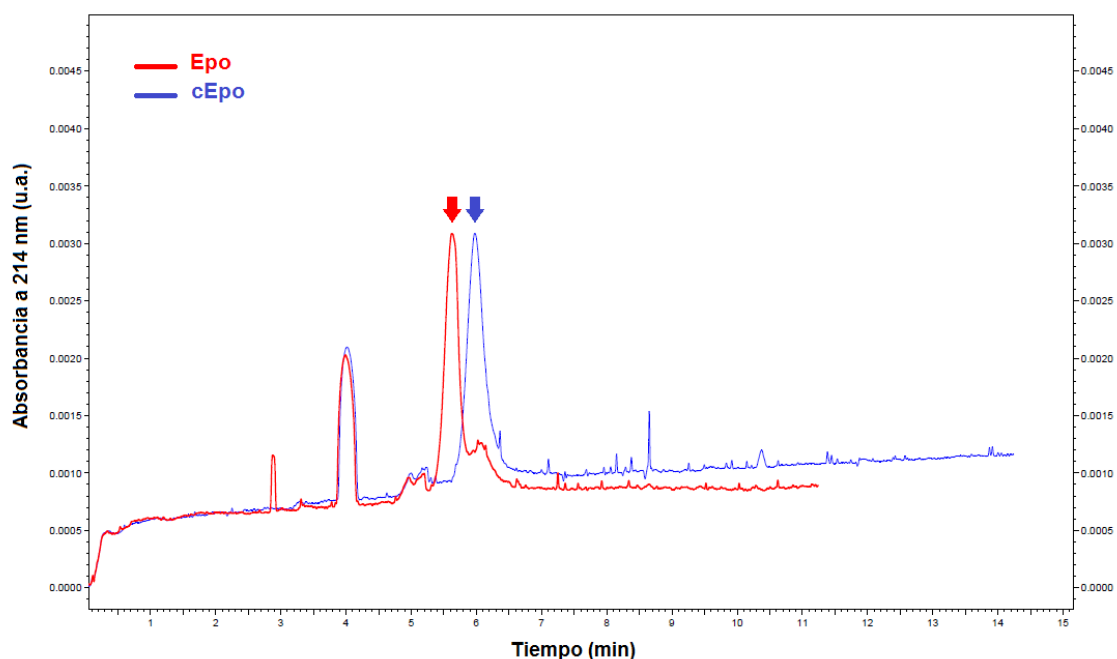


Figura VII. Electroforesis capilar de zona de muestras de Epo y cEpo. Las flechas representan los picos correspondientes a cada una de las eritropoyetinas. Electroferograma representativo de 2 experimentos independientes.

III.9.2 Caracterización funcional de cEpo

✦ *Estudio de la capacidad eritropoyética de Epo y cEpo*

Dado que la principal diferencia entre ambas eritropoyetinas radica en su capacidad de promover la proliferación y la viabilidad de células eritroides, se realizaron ensayos en cultivos de la línea celular UT-7, dependiente de Epo, para determinar el efecto de la carbamilación realizada.

Tinción con azul Tripán y recuento en cámara de Neubauer modificada:

Cultivos de células UT-7 fueron lavados con PBS e incubados durante 18 h en medio IMDM suplementado con 10% de SFB en ausencia de Epo para inducir quiescencia celular. Posteriormente, 600.000 células/tratamiento fueron incubadas en medio IMDM con SFB 10% en presencia de Epo o cEpo (16 ng/mL) durante 48 h adicionales, al cabo de las cuales se realizaron los recuentos celulares diluyendo la suspensión al 50% con azul Tripán. Los recuentos para cada tratamiento se realizaron al menos por triplicado en cada experimento independiente.

Ensayo de MTT

El ensayo de MTT permite evaluar proliferación y viabilidad celular mediante un método colorimétrico. La densidad óptica de cada muestra depende del número de células, de su viabilidad y su actividad metabólica. A partir de los mismos cultivos tratados empleados para el

recuento celular, las suspensiones celulares fueron divididas en tres partes, cada una de ellas incubada por 2 h en presencia de MTT 0,5 mg/mL en medio IMDM. Tras la incubación, las células fueron lavadas y el producto coloreado formazán fue solubilizado con HCl 0,04 M en isopropanol. La determinación de absorbancia a 570 nm (con λ de referencia 660 nm) se realizó en un lector de microplacas (Biorad) a partir de 90 μ L de la solución de formazán obtenida. El valor obtenido para cada tratamiento en cada experimento independiente corresponde al promedio de los triplicados.

A diferencia de Epo, cEpo no fue capaz de estimular la proliferación de células UT-7, ni de mantener su viabilidad, como lo muestran los recuentos celulares y los ensayos de MTT de la **Figura VIII**.

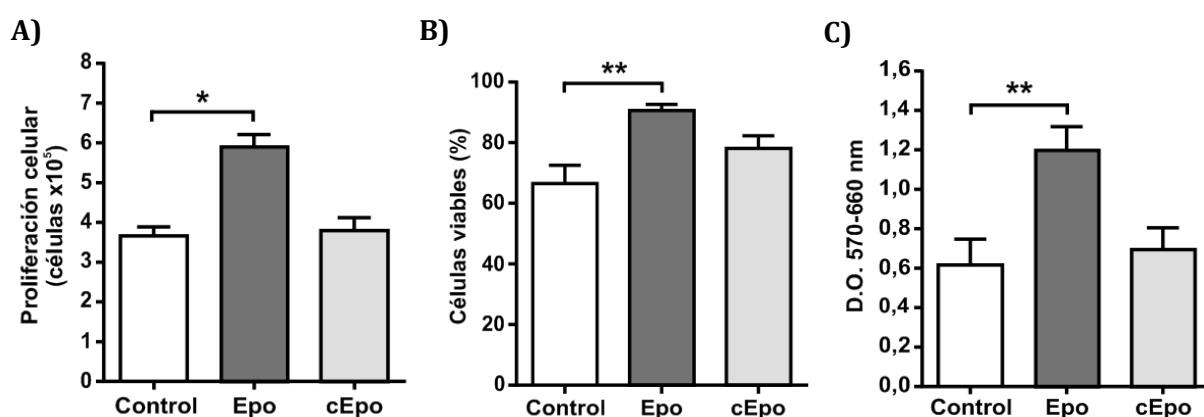


Figura VIII. Proliferación y viabilidad de células UT-7 expuestas a Epo o cEpo. A) Recuento de células de la línea eritroide UT-7 en cámara de Neubauer (n=3). B) La viabilidad celular fue evaluada por dilución de alícuotas de las suspensiones celulares con el colorante azul Tripán (n=5). C) Ensayo colorimétrico de proliferación y viabilidad celular por MTT (n=5). *P<0,05 y **P<0,01; Kruskal Wallis-Dunn.

✦ **Ensayo de protección frente a apoptosis inducida por staurosporina en células de neuroblastoma SH-SY5Y**

Como fuera reportado anteriormente por nuestro grupo de investigación (Wenker et al., 2010; Chamorro et al., 2013), la staurosporina, un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), funciona como potente inductor de apoptosis en diversos tipos celulares, entre los cuales se encuentra la línea de neuroblastoma SH-SY5Y.

El recuento de núcleos apoptóticos marcados con el colorante Hoechst 33258 mostró que la preincubación con Epo o cEpo fue capaz de prevenir el aumento del número de células SH-SY5Y apoptóticas causado por la exposición a STP (**Figura IX**). Sumados a los ensayos de viabilidad y proliferación, estos resultados permitieron confirmar la carbamilación de la molécula de Epo, que provoca la pérdida de su actividad eritropoyética sin afectar su acción neuroprotectora, previo a realizar ensayos en células endoteliales.

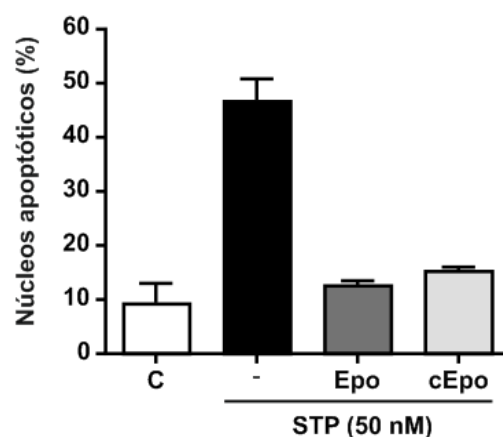


Figura IX. Efecto protector de Epo y cEpo frente a la apoptosis inducida por staurosporina (STP) en células SH-SY5Y. Los cultivos fueron preincubados durante 24 h con Epo o cEpo (200 ng/mL) y posteriormente tratados con staurosporina (50 μ M) por 24 h adicionales. Al cabo de los tratamientos, las células fueron fijadas y marcadas con Hoechst 33258. El análisis de las muestras consistió en el recuento diferencial de núcleos apoptóticos sobre 600 núcleos totales por tratamiento (n=2).

III.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (Media $\pm$ SEM). En los casos en los que se aplicó análisis de la varianza (ANOVA) o *test* de Kruskal Wallis, se realizó seguidamente *test* de Dunnet o de Dunn, respectivamente, para comparar entre grupos. Se consideró como mínima diferencia significativa un valor de $P < 0,05$.

Resultados y Discusión

CAPÍTULO I

Estudio comparativo de la capacidad angiogénica de eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada

Trabajos previos han reportado la actividad de la eritropoyetina (Epo) como una citoquina proangiogénica, promoviendo el crecimiento de células endoteliales tanto en modelos *in vitro* como en experimentos *in vivo*. Sin embargo, la capacidad de su derivado carbamilado (cEpo) para actuar como factor mitogénico es menos clara. Con el objetivo de estudiar comparativamente el potencial mitogénico de ambas eritropoyetinas, se evaluó la proliferación, la viabilidad y la progresión del ciclo celular de células endoteliales expuestas a Epo o a cEpo.

El proceso por el cual nuevos vasos sanguíneos se desarrollan a partir de arterias y venas preexistentes, denominado angiogénesis, no requiere solamente de la proliferación de células endoteliales y del reclutamiento de progenitores circulantes, sino que además involucra la capacidad del endotelio de migrar. Para completar el estudio del potencial angiogénico de ambas eritropoyetinas, se realizaron ensayos de migración por *wound healing* y formación de estructuras tubulares sobre un sustrato similar matriz extracelular.

I.1 Proliferación celular

I.1.1 Recuento en cámara de Neubauer

Como se observa en la **Figura 1 A**, el recuento celular en cámara de Neubauer reveló un efecto proliferativo de Epo (200 ng/mL) en cultivos de células EA.hy926 incubados durante 48 h en presencia de la citoquina. Igual concentración de cEpo no fue capaz de estimular la división celular en ese período, mientras que el tratamiento con SFB 10% provocó la mayor respuesta proliferativa.

Es interesante señalar que no se observaron diferencias significativas en el número de células cuando las mismas fueron incubadas con Epo o cEpo por 24 h.

El recuento celular en presencia del colorante de exclusión azul Tripán permitió determinar que las diferencias observadas en el número de células tras 48 h de tratamiento con Epo o cEpo no se debieron a cambios en la viabilidad de los cultivos, sino a efectos sobre el potencial mitogénico de los mismos (**Figura 1 B**).

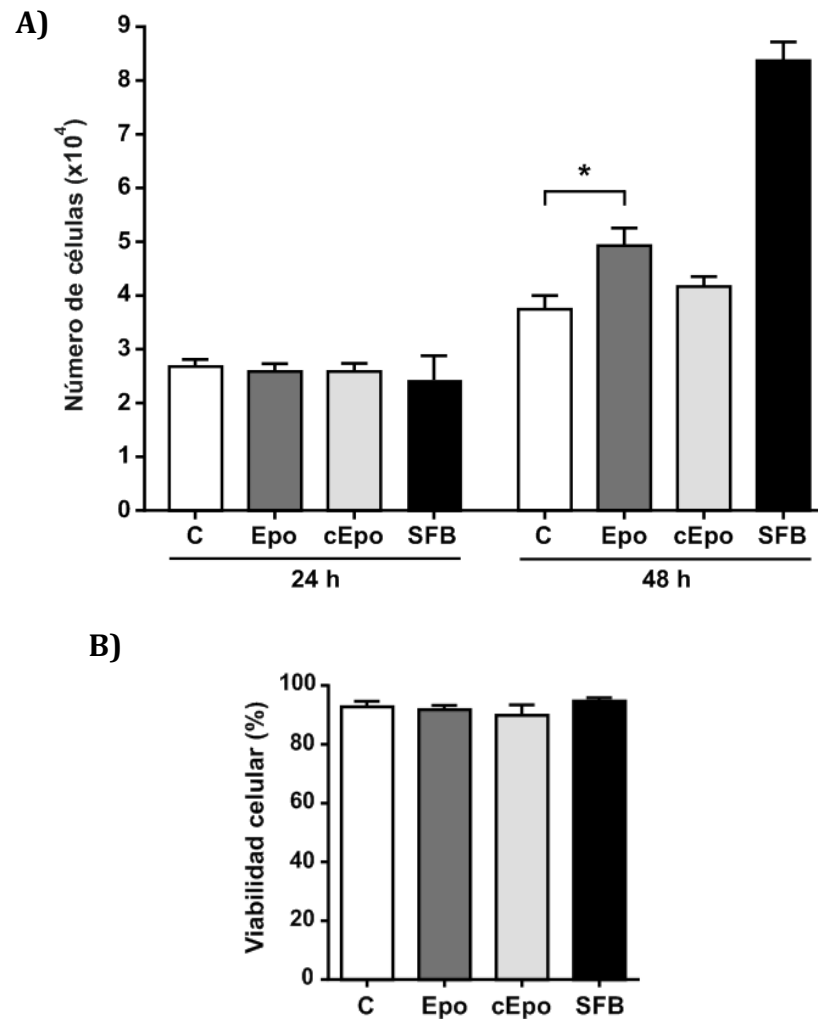


Figura 1. Proliferación de células EA.hy926 con Epo y cEpo. A) Recuento en cámara de Neubauer de suspensiones de células coloreadas con azul Tripán. Cultivos de células EA.hy926 (3×10^4 células/tratamiento) fueron incubados con Epo o cEpo (200 ng/mL) por 24 h (n=3) y 48 h (n=7). Como control positivo de proliferación se emplearon cultivos tratados con SFB 10%. Las barras muestran media $\pm$ SEM del número final de células en cada tratamiento. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn. **B)** Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de células viables en cada grupo experimental, determinado a partir de la exclusión del colorante azul Tripán por células expuestas durante 48 h a los tratamientos mencionados en A. No se observaron diferencias significativas (n=7).

I.1.2 Estudio del ciclo celular

Para completar el estudio de la acción de Epo y cEpo sobre la proliferación de células endoteliales, se realizaron determinaciones del ciclo celular en cultivos de células EA.hy926 marcados con yoduro de propidio, mediante citometría de flujo. La estandarización del ensayo permitió fijar un período de incubación de 15 h como el óptimo para la detección de diferencias entre los tratamientos, empleando como control SFB, un fuerte promotor de la mitosis *in vitro*.

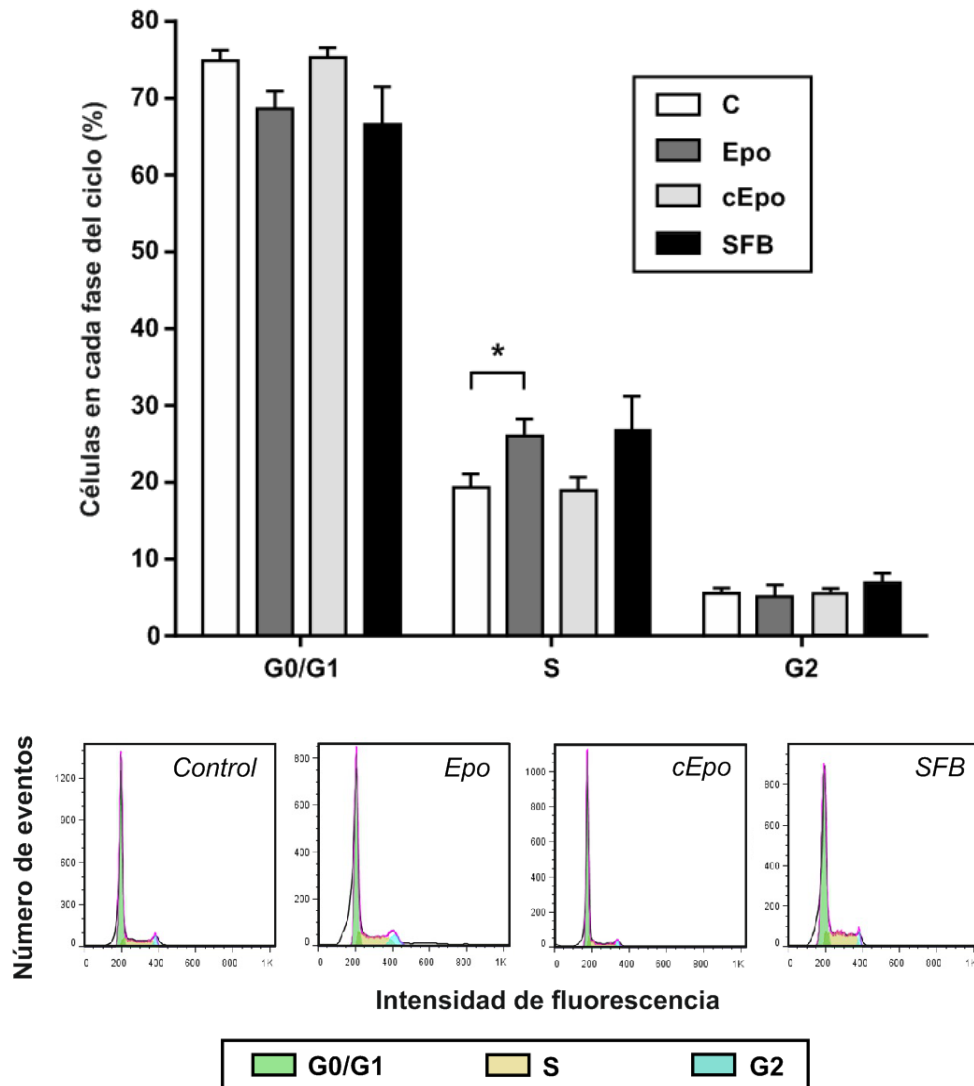


Figura 2. Ciclo celular en cultivos de células EA.hy926 tratados con Epo o cEpo. Tras 15 h de estimulación con Epo o cEpo (200 ng/mL), se estudió el ciclo celular en cultivos de células EA.hy926 por citometría de flujo mediante marcación del ADN con yoduro de propidio. Las barras muestran media $\pm$ SEM del porcentaje de células en cada fase del ciclo para cada uno de los tratamientos ensayados. Los histogramas muestran análisis representativos de cada tratamiento realizados con el *software* FloJo, donde cada color de sombreado representa las diferentes poblaciones celulares en fase G0/G1, S y G2 (*P<0,05, Kruskal Wallis-Dunn, n=5).

De acuerdo con lo esperado para el tratamiento con SFB, los cultivos mostraron un mayor número de células en proceso de duplicar su ADN, un evento que marca la fase S del ciclo celular (**Figura 2**). Esto es consistente con la disminución observada en el número de células en fase G0/G1, a las que se considera en arresto mitótico.

En línea con los resultados obtenidos por recuento en cámara de Neubauer, y en forma comparable a lo reportado para un factor mitogénico como el SFB, se observó un porcentaje significativamente mayor de células en fase S tras el tratamiento con Epo (200 ng/mL) que en el tratamiento con igual concentración de cEpo y en cultivos mantenidos en medio sin SFB

(Control). Al igual que en los cultivos desarrollados con SFB, la exposición a Epo también causó una disminución en la fracción de células en la fase G0/G1 con respecto a células no estimuladas o tratadas con cEpo, mientras que no se observaron diferencias entre los tratamientos en la fase G2. Estos resultados apoyan el efecto de la Epo, a diferencia de su derivado carbamilado, sobre la capacidad mitótica de la línea celular endotelial EA.hy926.

I.2 Migración y tubulogénesis

I.2.1 Ensayos de cierre de la herida (*wound healing*)

Con el fin de estudiar la migración de células endoteliales en respuesta a Epo o a cEpo, se realizaron ensayos de *wound healing* en cultivos deprivados de SFB por 8 h y mantenidos por 15 h adicionales en medio sin SFB en presencia de ambas eritropoyetinas.

Considerando los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación descritos en la sección anterior (Figura 1 A), la elección de un tratamiento de 15 h tras 8 h de deprivación de SFB permitió interpretar el cierre la herida como la consecuencia de una mayor actividad promigratoria, sin una contribución importante de la proliferación celular.

La incubación con Epo (200 ng/mL) estimuló significativamente la capacidad migratoria de las células EA.hy926 en comparación con cultivos no tratados (**Figura 3**), y en forma similar a lo observado en el tratamiento con el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, 10 ng/mL), un importante inductor de la motilidad de células endoteliales. Este incremento no fue observado en el tratamiento con cEpo a ninguna de las concentraciones ensayadas. Es interesante resaltar que el efecto promigratorio de Epo mostró un máximo en presencia de 200 ng/mL, disminuyendo nuevamente a mayores concentraciones. El efecto migratorio máximo se observó en la condición experimental incubada con SFB 10%.

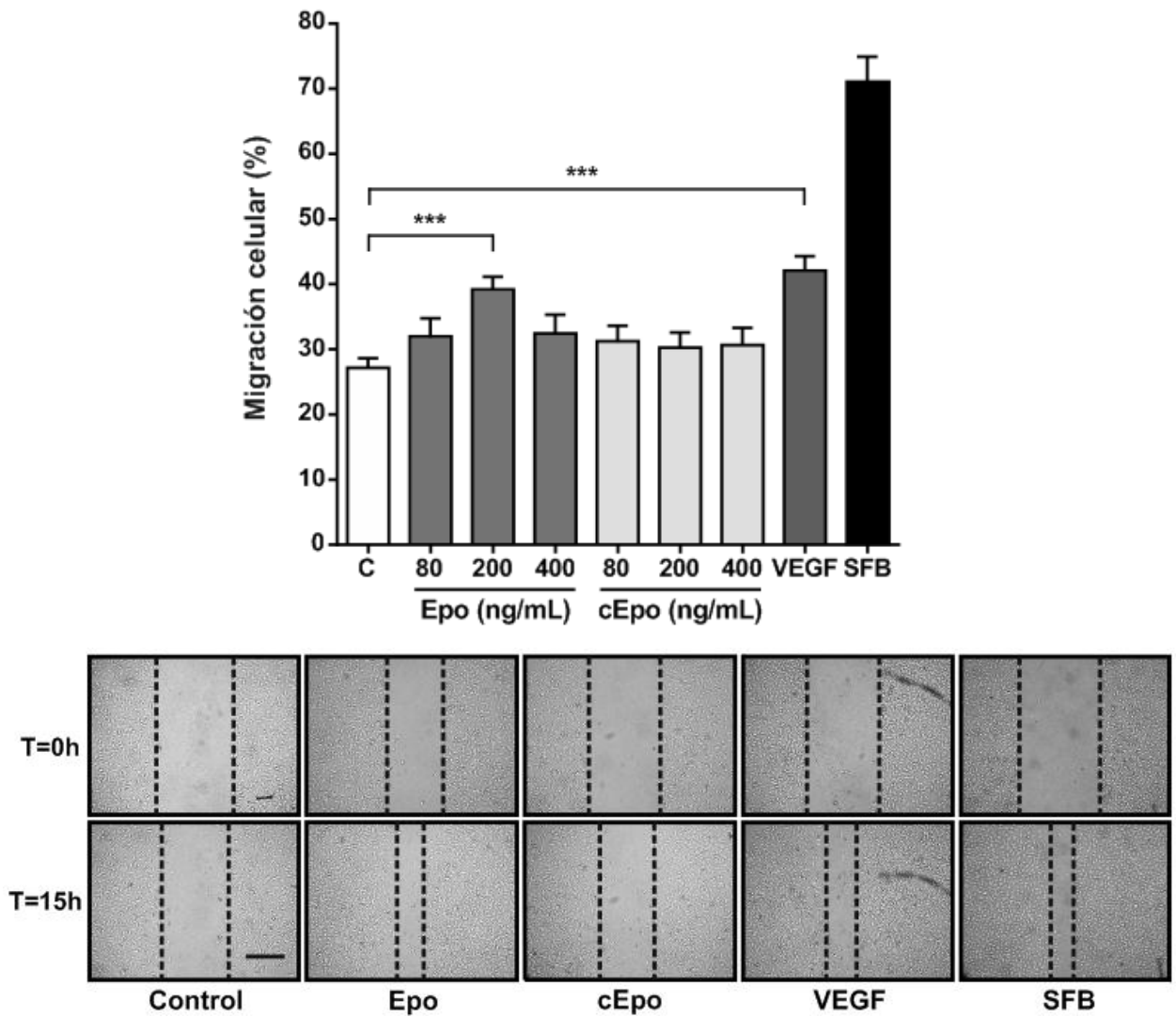


Figura 3. Migración de células endoteliales EA.hy926 en presencia de Epo y cEpo. Ensayo de wound healing en células EA.hy926 deprivadas de SFB por 8 h y luego expuestas a Epo o cEpo (80 – 400 ng/mL) en medio IMDM sin SFB por 15 h. Controles: cultivos sin SFB (C), con SFB 10% y con VEGF 10 ng/mL. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular, calculado midiendo el ancho de la herida a partir de fotografías tomadas a t = 0 y t = 15 h (**P<0,001, Kruskal Wallis-Dunn, n=12). Las fotografías (magnificación: 50X) son representativas de los tratamientos ensayados (la línea negra representa 500 μ m).

Los efectos de Epo y cEpo sobre la migración de células primarias HUVEC (**Figura 4**) fueron comparables a los obtenidos en la línea celular derivada EA.hy926, corroborando la elección de esta línea como modelo experimental de endotelio vascular. Por otro lado, el tratamiento de células microvasculares HMEC-1 con Epo y cEpo arrojó los mismos resultados en cuanto al rol de ambas eritropoyetinas en la migración endotelial (**Figura 5**), sugiriendo la prevalencia de este efecto sobre la heterogeneidad del endotelio.

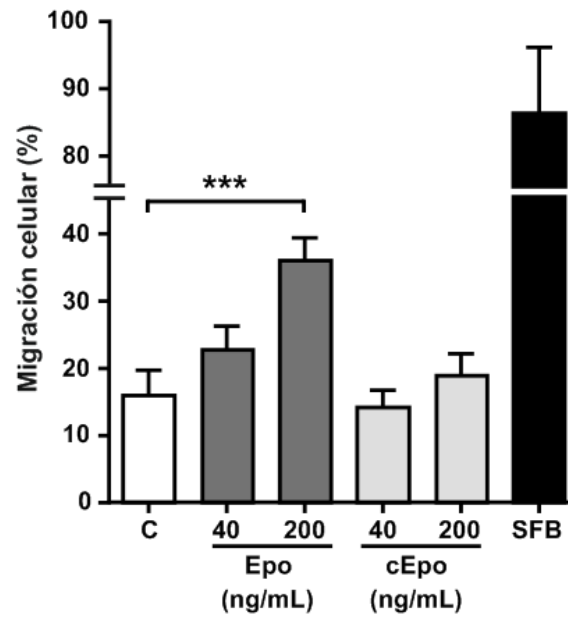


Figura 4. Migración de células endoteliales primarias HUVEC en presencia de Epo y cEpo. Ensayo de *wound healing* con células primarias de endotelio de vena umbilical humana (HUVEC) deprivadas de SFB por 8 h y luego expuestas a Epo o cEpo (40 y 200 ng/mL) durante 24 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular (** $P < 0,001$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 12$). Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 2%.

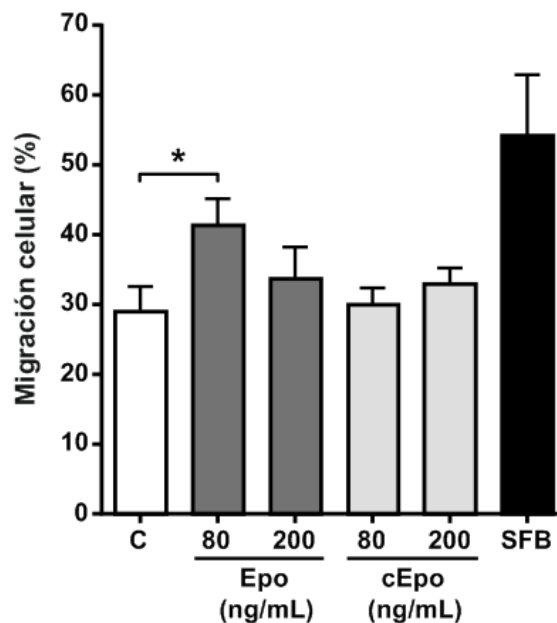


Figura 5. Migración de células endoteliales microvasculares HMEC-1 en presencia de Epo y cEpo. Ensayo de *wound healing* con células de la línea celular de endotelio microvascular dérmico humano (HMEC-1) deprivadas de SFB por 8 h y luego expuestas a Epo o cEpo (80 y 200 ng/mL) por 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular (* $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 4$). Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%.

1.2.2 Formación de túbulos de células endoteliales

Para el estudio de la capacidad tubulogénica de células EA.hy926 tratadas con Epo o su derivado carbamilado se cuantificó, mediante el cálculo del índice desarrollado por Aranda y Owen (2006), el potencial angiogénico de ambos compuestos.

Como se observa en la **Figura 6**, la máxima respuesta tubulogénica fue obtenida por incubación con SFB 2%, en consonancia con los resultados de migración por *wound healing*. En ausencia de SFB (condición Control), las células tienden a asociarse espontáneamente, formando una red laxa de túbulos delgados de 1 ó 2 células de espesor, que se conectan entre sí en forma poligonal. El tratamiento con SFB 2% estimuló el engrosamiento de estas estructuras superando las 4 células de espesor, con la consecuente disminución en el número de polígonos.

La incubación de 24 h con Epo (200 ng/mL) aumentó significativamente la formación de túbulos con respecto al Control, mientras que cEpo a igual concentración no presentó un efecto tan marcado. Como se observa en las microfotografías de la **Figura 6**, en el tratamiento con Epo aparecen estructuras tubulares más engrosadas, semejantes a las observadas con SFB.

Es importante mencionar que a una menor concentración de Epo (80 ng/mL), la actividad proangiogénica ya es apreciable y cercana al máximo, mientras que no se observa efecto del derivado carbamilado.

1.2.3 Modificaciones en el citoesqueleto

La migración celular requiere de modificaciones dinámicas en el citoesqueleto, que acompañan el movimiento de la célula. Con el objetivo de observar posibles cambios en la disposición de los filamentos de actina de células EA.hy926 debidos al tratamiento con Epo o cEpo (200 ng/mL) en ensayos de migración, las células fueron fijadas y marcadas con faloidina-TRITC para su visualización por microscopía confocal.

A diferencia de la condición Control, donde la distribución del fluoróforo fue más difusa, las células tratadas con Epo exhibieron una disposición cortical de la actina, así como también fibras de estrés, siendo ambas características compatibles con un fenotipo migratorio (**Figura 7**). Las células incubadas con cEpo sólo presentaron una tenue marca cortical, lo que las hace más similares a la condición Control. En todos los tratamientos se observaron filopodios, protrusiones delgadas de actina revestidas de membrana que la célula emite como sensores del medio.

Los cambios morfológicos descritos son consistentes con los resultados obtenidos en ensayos de migración y tubulogénesis, y apoyan la acción de Epo como un inductor de la motilidad celular, a diferencia de su derivado carbamilado.

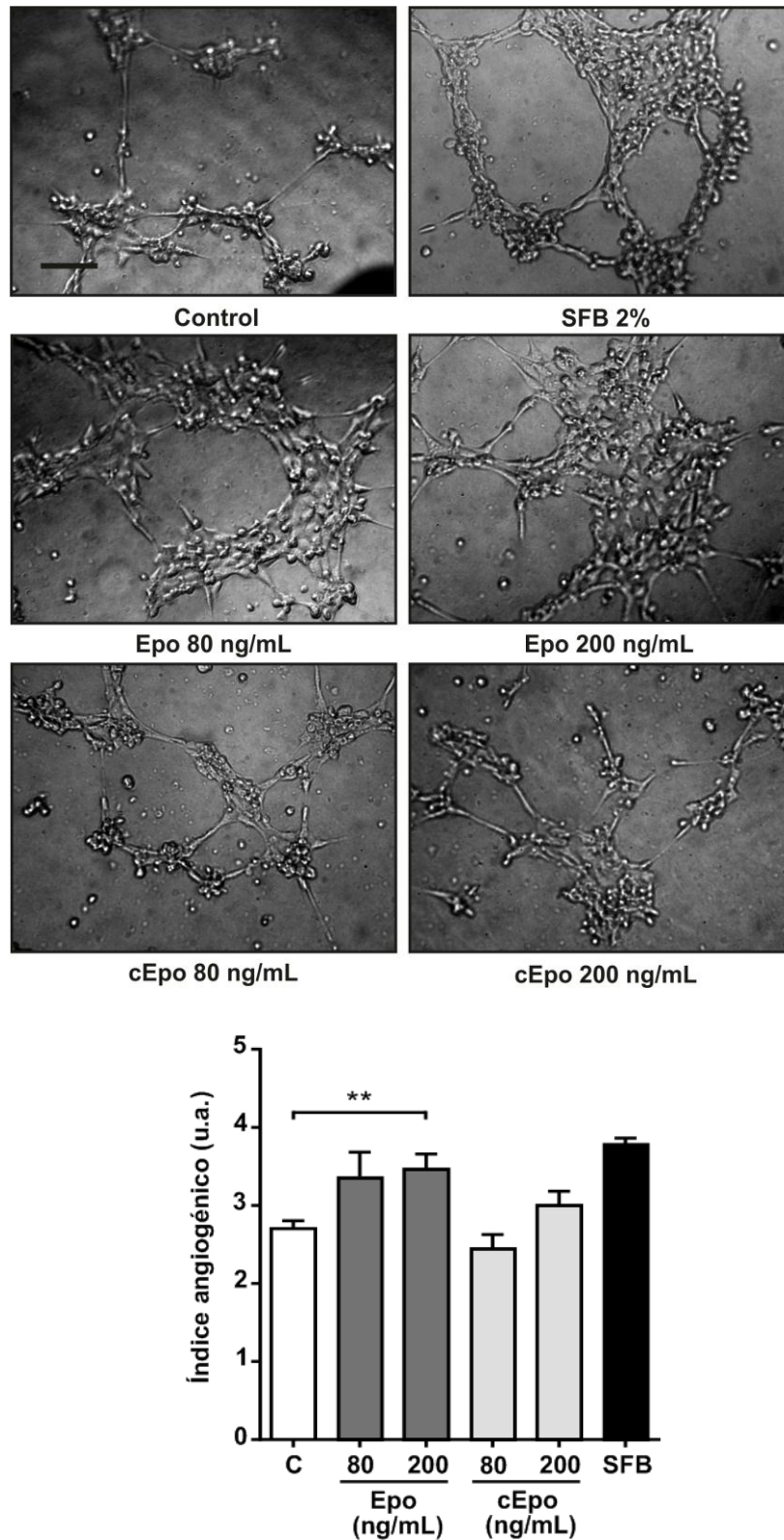


Figura 6. Formación de túbulos de células endoteliales en presencia de Epo y cEpo. Células EA.hy926 fueron deprivadas de SFB (18 h) y luego incubadas (24 h) con Epo o cEpo a las concentraciones indicadas, sobre una matriz de Geltrex (Gibco) colocada en el fondo de pocillos de placa de 96. Al cabo de la incubación se tomaron 10 fotografías por tratamiento, a partir de las cuales se calculó el índice angiogénico desarrollado por Aranda y Owen (2006; ver Materiales y Métodos). Controles: cultivos sin SFB (Control) y con SFB 2%. Las barras muestran media $\pm$ SEM de dicho índice (** $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=7$). La barra negra representa 100 μ m.

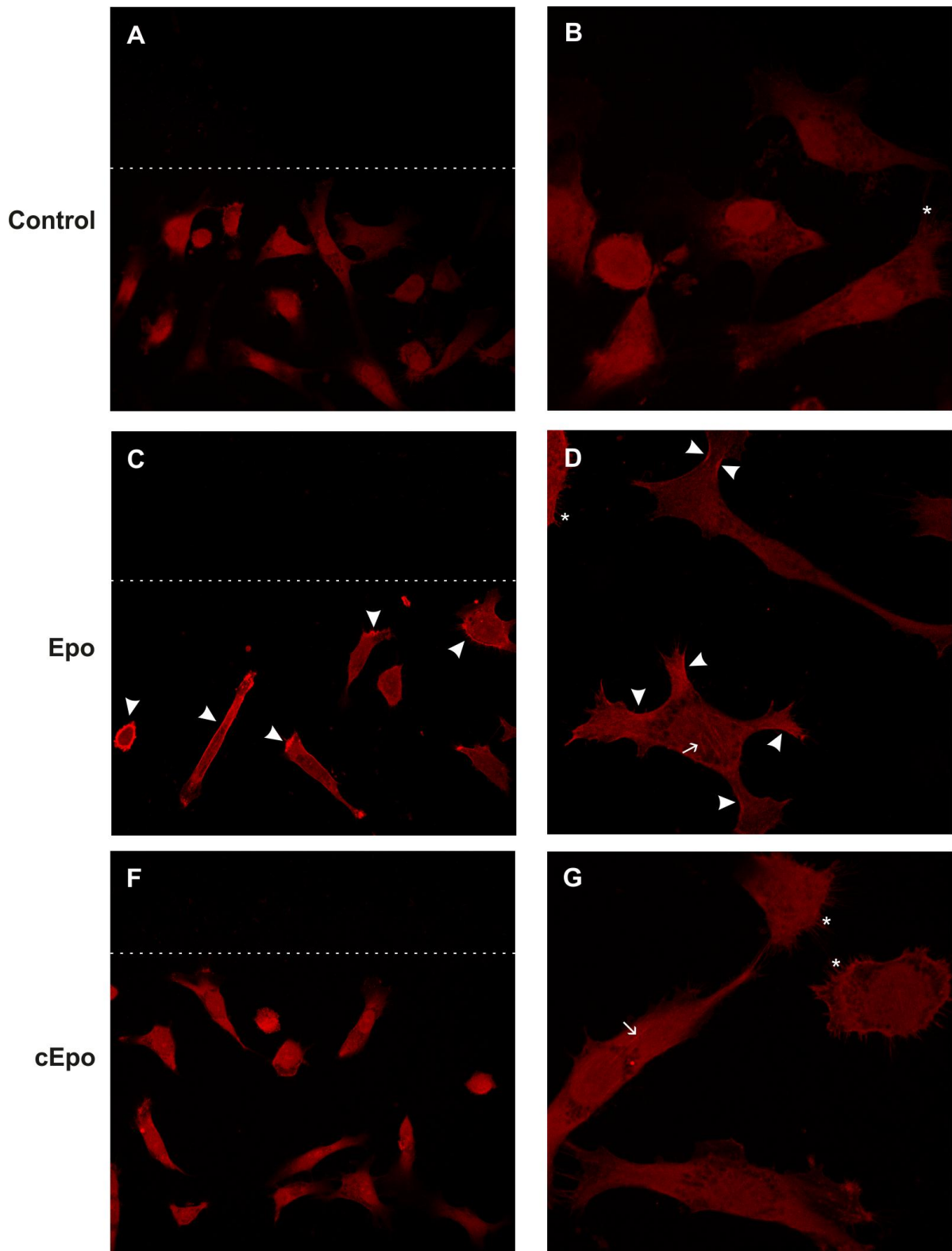
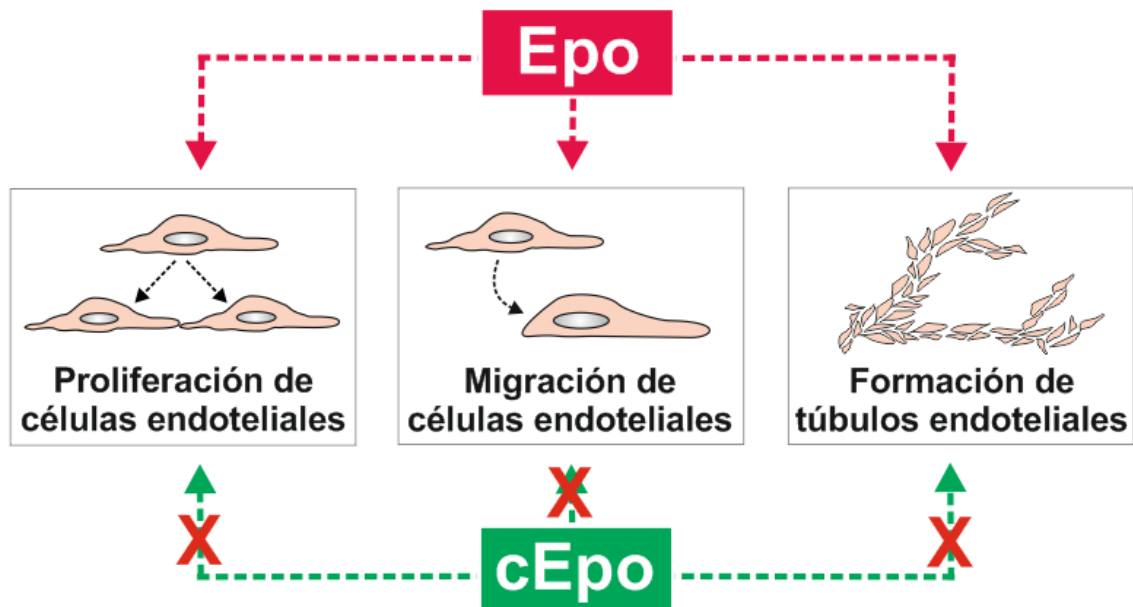


Figura 7. Modificaciones en el citoesqueleto de actina en respuesta a Epo y cEpo. Células EA.hy926 fueron incubadas por 30 min con Epo o cEpo (200 ng/mL) y, luego del ensayo de migración celular por 15 h, fueron fijadas y marcadas con faloidina-TRITC para su posterior visualización por microscopía confocal. La línea punteada indica la herida producida por el *tip* de pipeta. Las cabezas de flecha indican actina cortical, las flechas enteras indican fibras de estrés y los asteriscos muestran filopodios. Las fotografías fueron tomadas a una magnificación de 60X (A, C, F) y a 60X con *zoom* adicional de 2,5X (B, D, G).

I.3 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- **Epo estimula la proliferación, la migración y la capacidad tubulogénica de células endoteliales EA.hy926, con un efecto dependiente de la concentración.**
- **La acción estimuladora de Epo sobre la migración celular se ve reflejada en cambios en la disposición del citoesqueleto de actina.**
- **Tras ser carbamilada, la molécula de Epo pierde su actividad proangiogénica.**
- **El efecto diferencial de Epo y cEpo fue observado tanto en células del endotelio macrovascular (HUVEC y EA.hy926) como de la microvasculatura (HMEC-1), demostrando ser consistente sobre la heterogeneidad de este tipo celular.**



Discusión Capítulo I

La angiogénesis es un proceso complejo que involucra no solamente la migración y la proliferación de células endoteliales ya diferenciadas, sino también el reclutamiento de progenitores endoteliales circulantes (EPCs). Trabajos previos han descrito la actividad proangiogénica de Epo sobre diferentes modelos endoteliales, tales como cultivos primarios de HUVECs (Anagnostou et al., 1990; Du et al., 2012) y células endoteliales de aorta bovina conocidas como BAECs (Anagnostou et al., 1990; Su et al., 2011), además de EPCs (Sautina et al., 2010).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo ponen en evidencia el efecto de Epo sobre la proliferación (Fig. 1) y la progresión del ciclo celular (Fig. 2) en células EA.hy926, que no se conserva tras la carbamilación de la citoquina. Si bien existe consenso acerca de la capacidad mitogénica de la citoquina nativa tanto en células endoteliales maduras como en progenitores endoteliales (Heeschen et al., 2003; Ribatti et al., 1999), el efecto de la proteína después de su carbamilación continúa siendo poco claro. Mientras que algunos autores han sugerido que la acción protectora de cEpo en modelos animales de injuria cerebral traumática (Xiong et al., 2011) y daño renal por isquemia-reperfusión (Imamura et al., 2000) involucran la angiogénesis, los ensayos realizados en este Capítulo muestran que cEpo es incapaz de estimular la proliferación de células EA.hy926, en concordancia con los resultados obtenidos por Coleman et al. (2006) en células HUVEC. Sin embargo, en el mismo trabajo, los autores demostraron que cEpo actúa como un estímulo mitogénico para EPCs, sugiriendo una acción diferencial de la citoquina modificada sobre células endoteliales maduras y progenitores endoteliales. En desacuerdo, Ramírez et al. (2009) más tarde reportaron la incapacidad de la darbepoetina carbamilada de inducir la proliferación de EPCs. Estas discrepancias entre diferentes trabajos hacen necesario a futuro un mayor conocimiento de los efectos de cEpo en el endotelio maduro y en células progenitoras endoteliales.

Los resultados presentados en este Capítulo muestran que la actividad proliferativa de Epo está asociada al estímulo de la capacidad migratoria en células de la línea endotelial EA.hy926 (Fig. 3). En este punto, es interesante resaltar el efecto concentración-dependiente de Epo sobre la migración celular, que tuvo su máximo en 200 ng/mL y decreció a concentraciones más elevadas. Este tipo de curva concentración-respuesta de forma acampanada ha sido descrita anteriormente para otras citoquinas proangiogénicas tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), un potente agente quimiotáctico para células endoteliales entre los 5 y los 20 ng/mL, pero que no presenta un efecto significativo a concentraciones inferiores o

superiores a este rango (Rousseau et al., 1997). Estos patrones de respuesta podrían indicar el desencadenamiento de mecanismos de inhibición del receptor tras la unión del ligando.

De acuerdo con lo observado en los experimentos de proliferación, la carbamilación de la proteína impidió la actividad promigratoria ejercida por Epo, con diferencias despreciables entre las distintas concentraciones ensayadas. En forma consistente con los resultados obtenidos en ensayos de migración celular, Epo provocó cambios en la disposición del citoesqueleto de actina que fueron compatibles con un fenotipo migratorio, mientras que cEpo no exhibió este efecto (Fig. 7).

Es importante resaltar que, en cuanto a la actividad promigratoria de Epo y cEpo, se obtuvieron resultados similares tanto en células endoteliales macrovasculares HUVEC y EA.hy926 (Fig. 3 y 4) como en células HMEC-1 de la microvasculatura (Fig. 5). En los experimentos realizados, la heterogeneidad del endotelio se reflejó en una diferente sensibilidad a la Epo, dado que esta citoquina fue capaz de estimular la migración de células HMEC-1 a una concentración mucho menor (80 ng/mL) a la empleada en células EA.hy926 (200 ng/mL).

El ensayo de formación de túbulos endoteliales sobre un sustrato similar matriz extracelular es ampliamente utilizado en la actualidad, ya que es rápido, cuantitativo, permite estudiar un gran número de compuestos anti y proangiogénicos, y reduce el uso de animales en las primeras etapas de evaluación de un compuesto. Este ensayo integra todos los pasos involucrados en el proceso de angiogénesis, como adhesión, migración, proliferación, actividad proteolítica y formación de túbulos, lo que supone una ventaja con respecto a los ensayos que consideran sólo una o algunas de estas etapas (Arnaoutova et al., 2009). En el presente trabajo de Tesis doctoral, Epo fue capaz de estimular la formación de estructuras tubulares en células EA.hy926. Por otra parte, si bien el efecto de cEpo sobre la tubulogénesis tendió a aumentar con la concentración, no resultó significativamente distinto al del Control (Fig. 6). Estos resultados corroboran lo observado en los ensayos de proliferación y migración por *wound healing* ya mencionados, y coinciden con los de Ribatti et al. (1999), quienes reportaron un incremento en la tubulogénesis mediada por Epo en cultivos de células HUVEC, y un aumento en la densidad de capilares en membranas corioalantoicas de pollo tratadas con esta citoquina.

En conjunto, los resultados presentados en este Capítulo muestran una acción diferencial de Epo y de su derivado carbamilado sobre la angiogénesis.

CAPÍTULO II

Receptores y mecanismos de acción de eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada en células endoteliales

Los resultados de proliferación, migración y tubulogénesis obtenidos en células EA.hy926 muestran el comportamiento proangiogénico de Epo que su derivado carbamilado no conserva. En tejidos no hematopoyéticos se ha demostrado que Epo actúa a través de un receptor diferente al dímero EpoR-EpoR, que media su acción eritropoyética (Brines et al., 2004). Este receptor alternativo está formado por la subunidad EpoR y una subunidad β -common (β cR), presente en los receptores de GM-CSF, IL-3 e IL-5.

Por otra parte, si bien se ha demostrado una baja afinidad de cEpo por EpoR, el receptor clásico de Epo (Leist et al., 2004), Brines et al. (2004) determinaron que la citoquina carbamilada requiere del heteroreceptor para ejercer su acción citoprotectora. En línea con estos resultados, trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación muestran que cEpo presenta un efecto antiapoptótico en células neuronales mediado por la subunidad β cR (Chamorro et al., 2013), pero que no es capaz de promover la diferenciación y el crecimiento de progenitores eritroides debido a un cierre prematuro de su señal (Chamorro et al., 2015).

A partir de estos antecedentes, el siguiente objetivo fue investigar las vías de transducción de señales involucradas en el efecto proangiogénico de Epo, así como los mecanismos por los cuales cEpo no presenta dicha actividad.

II.1 Expresión de receptores

La presencia del receptor de eritropoyetina (EpoR) y, particularmente, la del receptor β -common (β cR) en células endoteliales ha sido motivo de controversia. Por lo tanto, en primer lugar se estudió la expresión de ambas subunidades en las células EA.hy926, tanto a nivel de ARNm como de proteína.

El análisis de los niveles de ARNm de las subunidades EpoR y β cR mediante RT-PCR (**Figura 8**) mostró una menor expresión de ambas proteínas en células EA.hy926 en comparación con la observada en la línea celular eritroleucémica UT-7, dependiente de Epo, empleada como control positivo.

Por otro lado, mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos se detectó la expresión de ambos receptores a nivel de proteína tanto en células de la línea EA.hy926 como en células primarias HUVEC y también en cultivos de la línea celular de endotelio microvascular dérmico humano HMEC-1 (Figura 9).

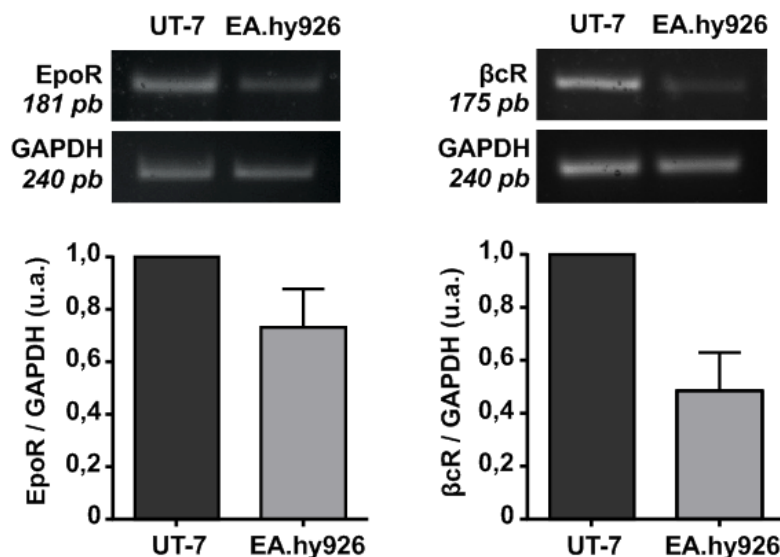


Figura 8. Detección de los niveles de ARNm de los receptores EpoR y βcR en células EA.hy926 por RT-PCR. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa, y cuantificados por densitometría de bandas con el *software* ImageJ. Cada barra representa media ± SEM de la densidad de banda con respecto a GAPDH, empleado como control (n=3). La densidad de banda obtenida en células EA.hy926 fue normalizada a la de las células UT-7.

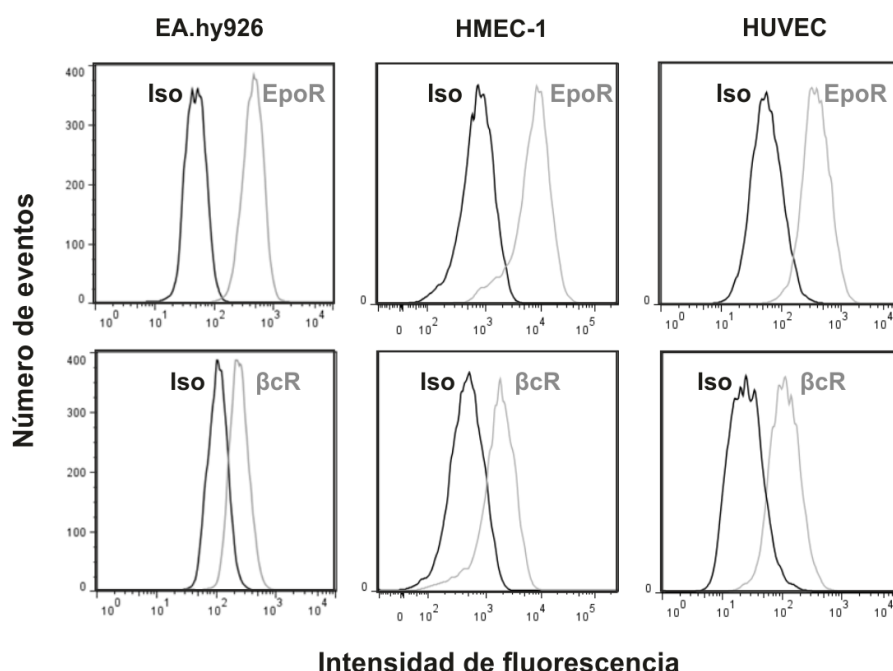


Figura 9. Expresión de EpoR y βcR a nivel de proteína en células endoteliales mediante citometría de flujo. Células HUVEC, EA.hy926 y HMEC-1 fueron fijadas y marcadas con anticuerpos primarios anti-EpoR o anti-βcR y luego con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con el fluoróforo Alexa Fluor 488. Los niveles de expresión de ambas subunidades fueron analizados por citometría de flujo. Iso: control isotipo. Los gráficos son representativos de 3 determinaciones independientes.

II.2 Receptores y vías de señalización involucradas en el efecto de Epo

II.2.1 Participación de EpoR y β cR y de las vías de transducción asociadas

Con el objetivo de determinar las vías de señalización implicadas en el efecto de Epo sobre la migración endotelial, se realizaron ensayos de *wound healing* en cultivos celulares de EA.hy926 tratados con Epo después de haber sido preincubados con un siRNA específico contra EpoR, anticuerpos bloqueadores anti-EpoR o anti- β cR, o bien inhibidores farmacológicos de diferentes vías de señalización asociadas a la citoquina.

La técnica de interferencia por siRNA se basa en la degradación de un ARNm específico mediada por el complejo enzimático RISC, que emplea como molde fragmentos complementarios provenientes del clivaje de un ARNm de doble cadena. Como se observa en la **Figura 10**, el bloqueo de la subunidad EpoR mediante un siRNA específico impidió el efecto promigratorio de Epo (200 ng/mL). Como control de transfección y de silenciamiento inespecífico se empleó un siRNA contra la proteína fluorescente verde GFP (*Green Fluorescent Protein*).

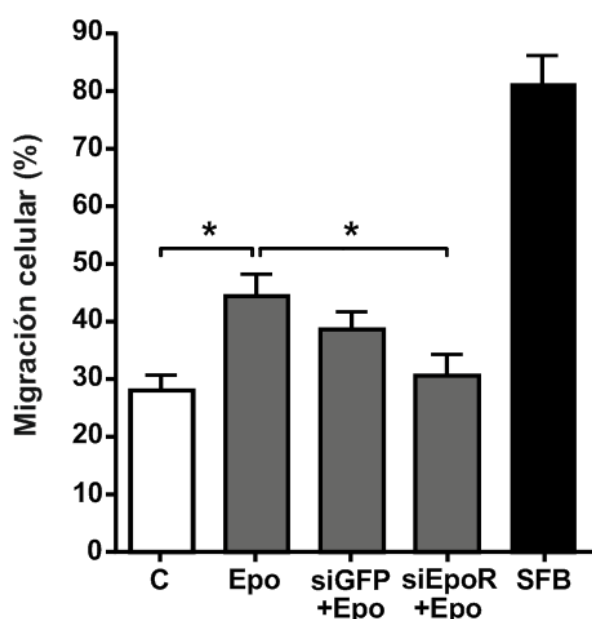


Figura 10. Participación de EpoR en la migración de células endoteliales inducida por Epo. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926 realizado 30 h después de la transfección con un siRNA específico contra EpoR. Los cultivos celulares fueron luego incubados con Epo (200 ng/mL) por 15 h. Un siRNA contra GFP fue empleado como control. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 4$. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%.

De manera consistente con este resultado, la migración celular inducida por Epo (200 ng/mL) también fue inhibida por preincubación con el anticuerpo anti-EpoR y con el inhibidor de JAK2 (AG490), sugiriendo que en células endoteliales Epo emplea una señalización similar a la demostrada en células eritroides (**Figura 11 A**). La migración de células EA.hy926 también se vio impedida por preincubación con LY294002 como inhibidor de PI3K (quinasa perteneciente a

la vía de señalización de Epo en diversos tipos celulares), pero no se vio afectada por el anticuerpo anti- β cR. Ensayos de migración por *wound healing* realizados en cultivos primarios de células HUVEC (**Figura 11 B**) en presencia de anticuerpos bloqueadores de EpoR y β cR mostraron la misma tendencia que en células EA.hy926.

Estos resultados sugieren la participación del receptor homodimérico EpoR-EpoR, y no del heteroreceptor EpoR- β cR, en la migración de células endoteliales inducida por Epo.

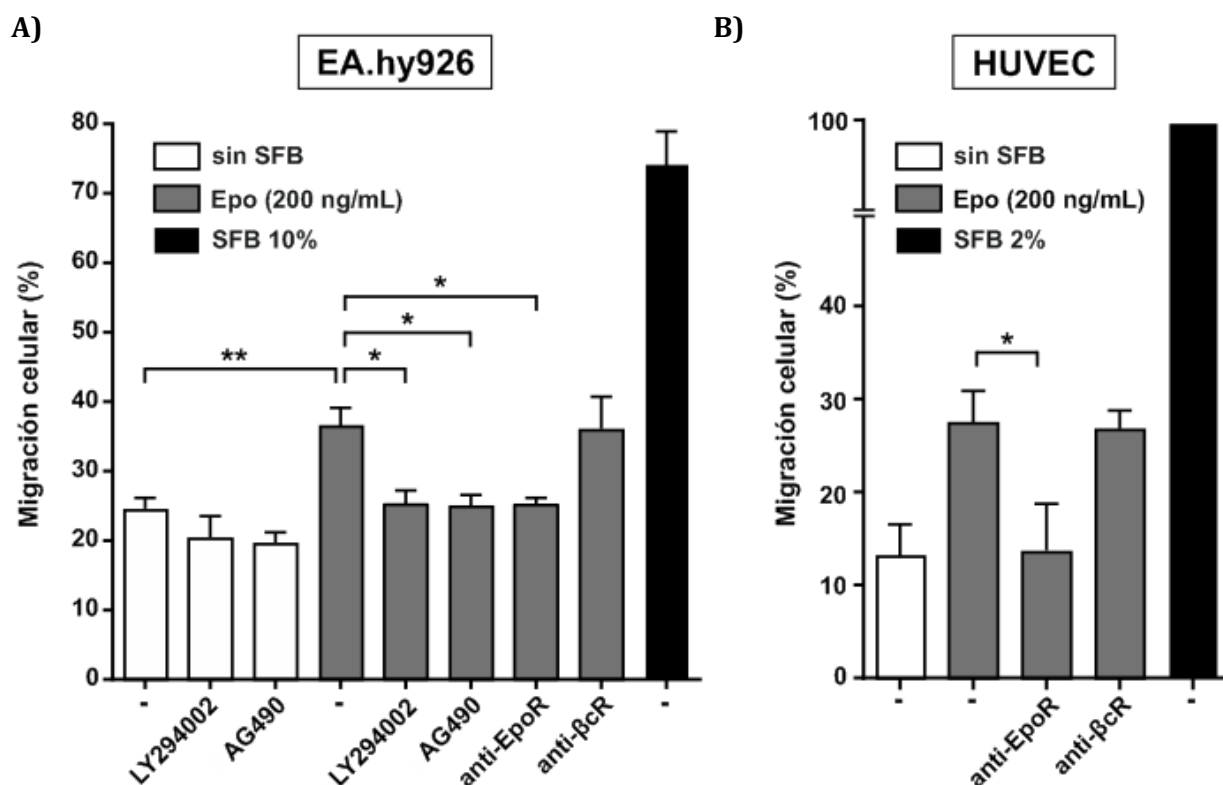


Figura 11. Receptores y vías de señalización involucradas en la migración de células endoteliales inducida por Epo. **A)** Ensayo de *wound healing* en cultivos de células EA.hy926 tratados con Epo (200 ng/mL) tras preincubación (1 h) con los inhibidores de PI3K (LY294002, 1 mM) y JAK2 (AG490, 1 mM), y con los anticuerpos bloqueadores de EpoR y β cR (400 ng/mL). Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, ANOVA-Dunnet, $n = 6$. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%. **B)** Ensayo de *wound healing* en células HUVEC tratadas con Epo (200 ng/mL) tras preincubación (1 h) con los anticuerpos bloqueadores de EpoR y β cR (400 ng/mL). Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 5$. Controles: cultivos sin SFB y con SFB 2%.

II.2.2 Funcionalidad del receptor β cR

Los experimentos de migración celular en presencia de un anticuerpo anti- β cR mostraron, tanto en células EA.hy926 como en HUVEC, que esta subunidad no participa del efecto promigratorio de Epo. A raíz de este resultado, y con el fin de determinar si los receptores β cR se encuentran funcionales en células endoteliales, se llevaron a cabo ensayos adicionales de *wound healing* en presencia de GM-CSF, el factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos, cuya actividad proangiogénica ha sido reportada anteriormente (Bussolino et al., 1991).

GM-CSF estimuló significativamente la migración de células EA.hy926, alcanzando un máximo a los 10 ng/mL para luego decrecer a mayores concentraciones (**Figura 12**). Este tipo de respuesta fue similar a la observada para diferentes concentraciones de Epo (ver Figura 3), y reportada por otros autores para VEGF (Rousseau et al., 1997). Por otro lado, la preincubación con el anticuerpo bloqueador anti- β cR inhibió la migración inducida por GM-CSF (10 ng/mL), corroborando la funcionalidad de la subunidad β cR, y además la capacidad de este anticuerpo para bloquear dicho receptor en células EA.hy926.

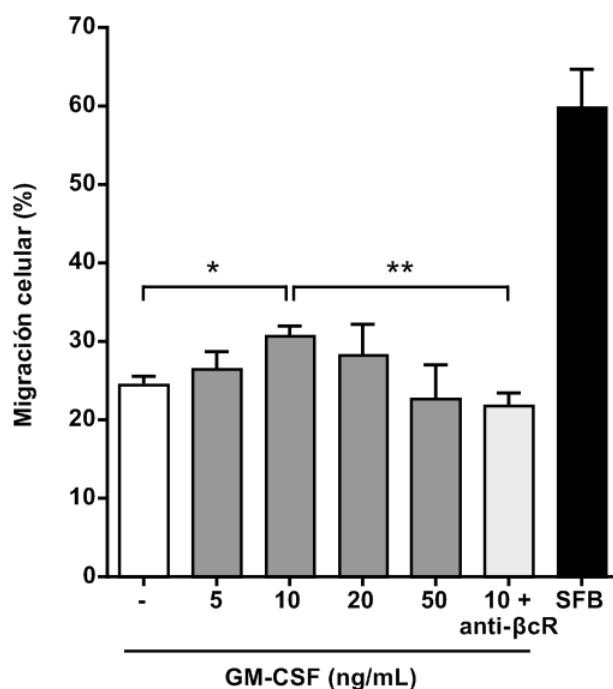


Figura 12. Participación de β cR en la migración de células EA.hy926 inducida por GM-CSF. Ensayo de *wound healing* en presencia de GM-CSF (5 - 50 ng/mL). El anticuerpo bloqueador de β cR (400 ng/mL) fue agregado 30 min antes del tratamiento con GM-CSF. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 6$. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%.

En resumen, los resultados reportados hasta aquí muestran que la subunidad β cR no participa del efecto promigratorio de Epo en células endoteliales, si bien sus niveles de expresión son detectables y se encuentra funcional.

II.2.3 Ensayos de competencia entre cEpo y Epo

Los resultados presentados hasta el momento sugieren la participación del receptor clásico EpoR-EpoR en la migración de células EA.hy926 estimuladas por Epo, sin intervención de la subunidad β cR. Para completar la evaluación de la participación de estos receptores se realizaron ensayos de competencia preincubando las células por 30 min con dos

concentraciones de cEpo: 200 u 800 ng/mL, y luego por 15 h adicionales con una concentración fija de Epo (200 ng/mL), a la que se observa una respuesta migratoria máxima.

La **Figura 13** muestra que la preincubación con un exceso de cEpo fue capaz de inhibir significativamente la acción promigratoria de Epo (200 ng/mL), sin observarse efecto a igual concentración de ambas eritropoyetinas.

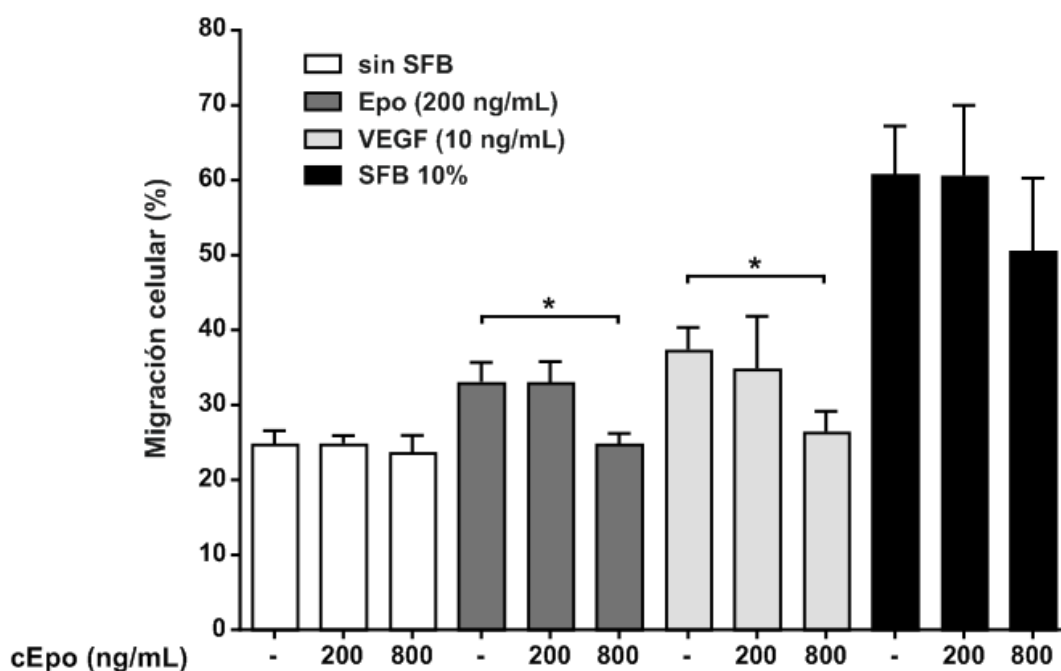


Figura 13. Ensayo de competencia entre cEpo y Epo. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926. cEpo (200 – 800 ng/mL) fue agregada 30 min antes del tratamiento con Epo (200 ng/mL), VEGF (10 ng/mL) o SFB 10% por 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=6$.

Estos resultados parecen contradecir lo observado en la Figura 11, donde la presencia de un anticuerpo bloqueador contra β cR no impidió la actividad de Epo, sugiriendo que no actúa como su mediador en la migración de células endoteliales. Sin embargo, es importante señalar que el efecto promigratorio de VEGF también se vio afectado por la mayor concentración de cEpo, disminuyendo a valores basales. Se ha reportado que VEGF ejerce su acción sobre el endotelio a través de un complejo entre su receptor VEGFR2 y EpoR (Yang et al., 2014), lo que llevó a plantear la hipótesis de que la disminución registrada en la migración inducida por Epo se debe a la competencia de ambas eritropoyetinas por la subunidad EpoR.

Por otro lado, la preincubación con cEpo (800 ng/mL) provocó una leve disminución en la migración inducida por SFB. Dado que el suero es una mezcla compleja de factores de crecimiento, no se puede descartar que cEpo esté afectando las vías de señalización de alguno de sus componentes.

II.2.4 Ensayos de competencia entre Epo y VEGF

Para poner a prueba la hipótesis anterior que sostiene la competencia de Epo y cEpo por la subunidad EpoR, se diseñaron experimentos para corroborar si ésta es requerida por VEGF en su efecto promigratorio en células endoteliales. Con este objetivo se realizaron ensayos de *wound healing* en células EA.hy926 preincubadas con Epo o con un anticuerpo bloqueador de EpoR, y luego tratadas con VEGF durante 15 h.

La preincubación con Epo tuvo un efecto inhibitorio sobre la migración inducida por VEGF (**Figura 14**), observado a partir de la menor concentración de Epo empleada (200 ng/mL) y con un máximo a una concentración cuatro veces mayor. De manera coincidente, también se observó inhibición de la actividad de VEGF por bloqueo de EpoR por un anticuerpo específico, lo que indicaría la competencia de ambas citoquinas por esta subunidad.

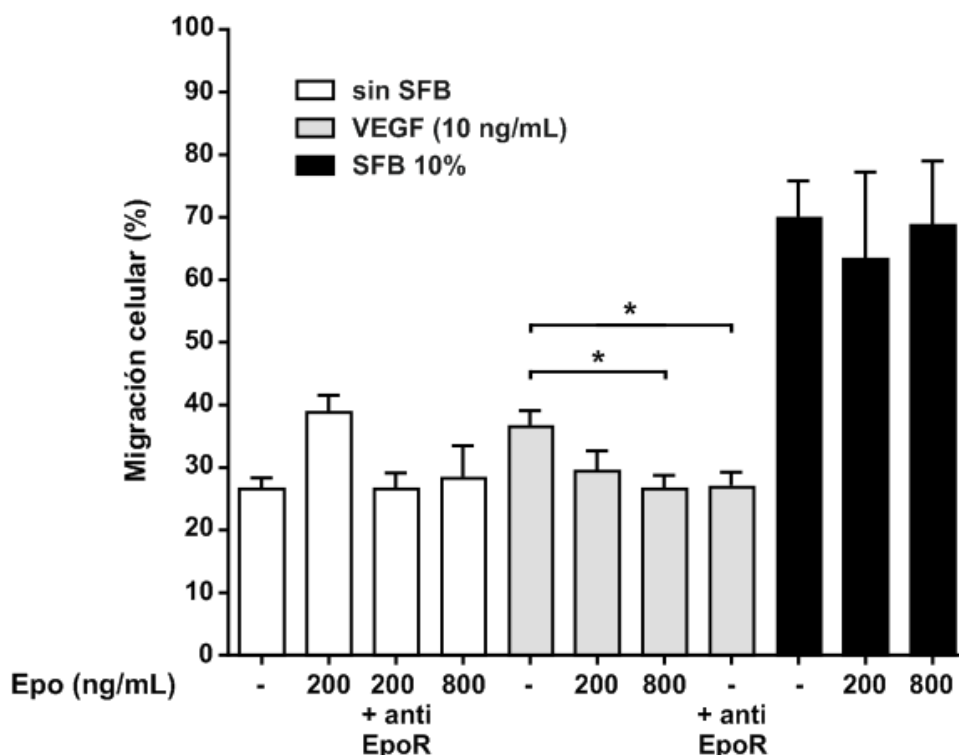


Figura 14. Participación de EpoR en el efecto promigratorio de VEGF. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926. Epo (200 ng/mL) o Epo+anti-EpoR (400 ng/mL) fueron agregados 30 min antes del tratamiento con VEGF (10 ng/mL) o SFB 10% por 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. *P<0,05, Kruskal Wallis-Dunn, n=6. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%.

En conjunto, estos resultados destacan la participación del EpoR tanto en la actividad de Epo como en la de VEGF, y sugieren que una alta concentración de cEpo podría reducir la disponibilidad de esta subunidad, interfiriendo con el efecto promigratorio de ambas citoquinas.

II.2.5 Fosforilación de JAK2

JAK2 es la Ser/Thr quinasa asociada al receptor de Epo, y el primer elemento de la vía de señalización de esta citoquina en activarse, a través de un mecanismo de autofosforilación. Mediante citometría de flujo con un anticuerpo específico anti-fosfoJAK2 (Tyr1007/1008) se determinaron los niveles de activación de esta quinasa tras la exposición a Epo o cEpo.

Ambas eritropoyetinas fueron capaces de estimular significativamente la fosforilación de JAK2 a los 10 min de tratamiento, si bien la magnitud del efecto de cEpo resultó menor (**Figura 15**) que el de Epo. Estos resultados indican que, tal como sucede en células eritroides (Chamorro et al., 2013), tanto Epo como su derivado carbamilado son capaces de estimular la activación de la quinasa asociada al receptor de Epo. Por lo tanto, las diferencias halladas entre la capacidad angiogénica de la Epo nativa y su derivado podrían estar relacionadas con otros elementos de la vía de señalización de Epo localizadas río abajo de JAK2.

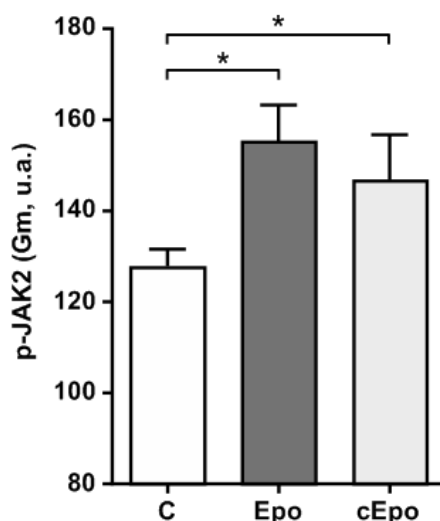


Figura 15. Fosforilación de JAK2. Células EA.hy926 fueron tratadas durante 10 min con Epo o cEpo (200 ng/mL), fijadas y marcadas con un anticuerpo primario específico contra fosfoJAK2 (p-JAK2) y luego con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488, previo a la adquisición de datos por citometría de flujo. Las barras representan media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (*Geometric mean*, Gm) de cada tratamiento, expresada en unidades arbitrarias. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 11$.

II.2.6 Fosforilación de AKT

Dado que tanto Epo como cEpo fueron capaces de estimular la fosforilación de JAK2, el siguiente objetivo fue estudiar la activación de AKT por fosforilación en Ser473. Esta quinasa es sustrato de PI3K, cuya participación en la migración de células EA.hy926 tratadas con Epo fue descrita anteriormente (Figura 10).

El tratamiento con Epo durante 15 min estimuló significativamente la fosforilación de AKT, que se mantuvo en niveles similares, por lo menos, hasta los 30 min (**Figura 16**). Por su parte, cEpo también indujo la activación de AKT, pero su efecto fue menos sostenido, decreciendo hasta el nivel del control hacia los 30 min.

Los resultados obtenidos muestran que tanto Epo como cEpo son capaces de activar vías de señalización, como las que involucran a JAK2 y AKT. Sin embargo, el efecto de cEpo parece ser algo menor en magnitud y menos sostenido en el tiempo.

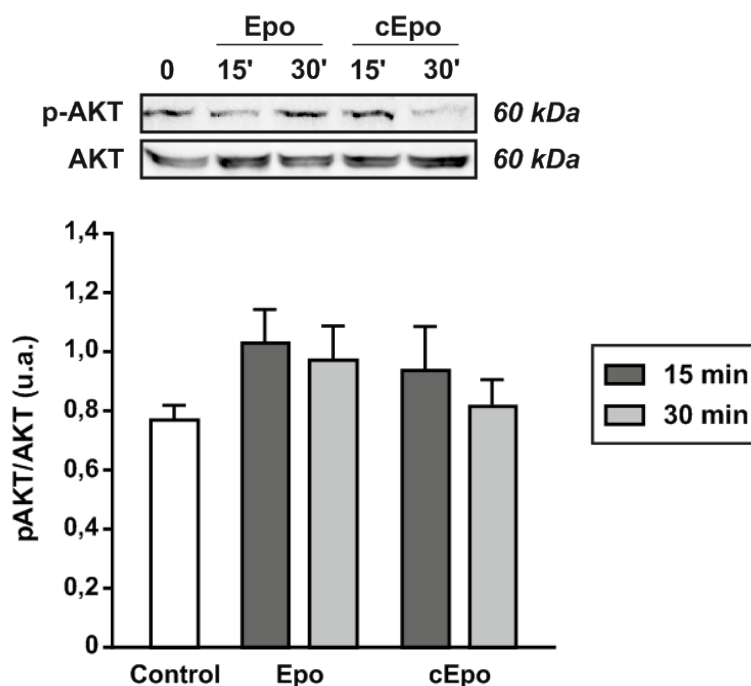


Figura 16. Fosforilación de AKT. Células EA.hy926 fueron tratadas durante 15 o 30 min con Epo o cEpo (200 ng/mL) y lisadas para el posterior análisis de la fosforilación de AKT por SDS-PAGE y *Western blotting*. La inmunodetección se realizó por incubación con anticuerpos primarios anti-AKT y anti-fosfoAKT (p-AKT) seguidos por los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa (HRP). Las bandas fueron visualizadas por quimioluminiscencia y cuantificadas por densitometría. Las barras representan media $\pm$ SEM de la densidad de bandas, cuantificada con el *software* ImageJ y expresada en unidades arbitrarias, con respecto a AKT, usado como control. Control vs. Epo 15 min: $P=0,0504$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=4$.

II.3 Participación de PTP1B en el efecto diferencial de Epo y cEpo sobre la migración de células endoteliales

El receptor de Epo se encuentra asociado a diferentes fosfatasa, que participan en la terminación de la señal activada por su ligando. Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación en células de la línea eritroide UT-7 mostraron un fuerte efecto inductor de cEpo sobre la expresión y la actividad de esta fosfatasa, en comparación con la citoquina nativa. Por lo tanto, la incapacidad de cEpo de estimular la diferenciación eritroide se encontró asociada a una terminación prematura de la señal (Chamorro et al., 2015).

En base a estos hallazgos en células eritroides, y al menor efecto de cEpo observado sobre la activación de células endoteliales, se postuló que una terminación más rápida de la señal debida a la actividad de fosfatasa podría estar involucrada en la acción diferencial de ambas eritropoyetinas sobre la angiogénesis.

II.3.1 PTP1B en la ausencia de efecto proangiogénico de cEpo

En ensayos de *wound healing* realizados en células EA.hy926, el tratamiento con el inhibidor de PTP1B, Cinnigel 2Me, permitió a cEpo (200 ng/mL) estimular la migración celular a niveles comparables con los obtenidos con igual concentración de Epo.

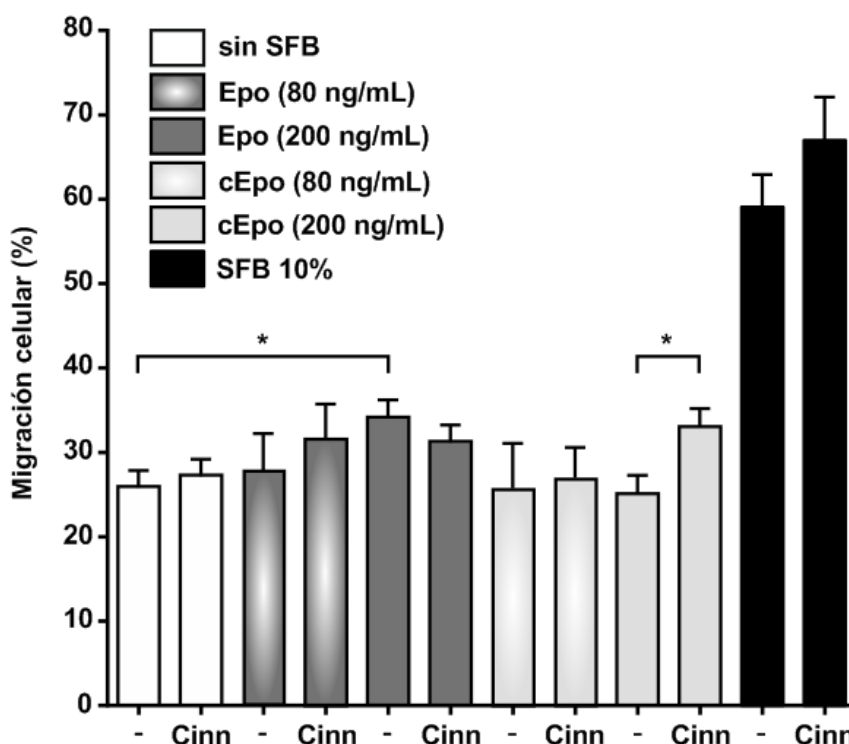


Figura 17. Participación de PTP1B en la acción diferencial de Epo y cEpo sobre la migración de células EA.hy926. Ensayo de *wound healing* en cultivos tratados con Epo o cEpo (80 y 200 ng/mL) preincubados (1 h) con el inhibidor de PTP1B, CinnGel 2Me (Cinn, 20 μ M). Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. Controles: cultivos sin SFB y con SFB 10%. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=12$.

Como se observa en la **Figura 17**, la inhibición de PTP1B no incrementó el efecto promigratorio de Epo a la concentración de 200 ng/mL, pero sí a una menor (80 ng/mL), sugiriendo un mecanismo de inhibición que podría compararse con el observado cuando se usó una concentración de Epo de 400 ng/mL (ver Figura 3). La inhibición de PTP1B no fue suficiente, sin embargo, para estimular la migración a una concentración de cEpo de 80 ng/mL.

II.3.2 Efecto de Epo y cEpo sobre los niveles de expresión de PTP1B

A raíz de los resultados obtenidos sobre la participación de PTP1B en la migración de células endoteliales, se decidió investigar posibles cambios en los niveles de expresión de la fosfatasa debidos al tratamiento con ambas eritropoyetinas.

Como se muestra en la **Figura 18**, el tratamiento con cEpo 200 ng/mL durante 15 h incrementó la expresión de PTP1B en células EA.hy926, a niveles mayores que los observados con Epo. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que la inactivación del receptor de Epo por sobreexpresión de la fosfatasa PTP1B puede explicar, al menos parcialmente, la actividad diferencial de ambas eritropoyetinas sobre células endoteliales.

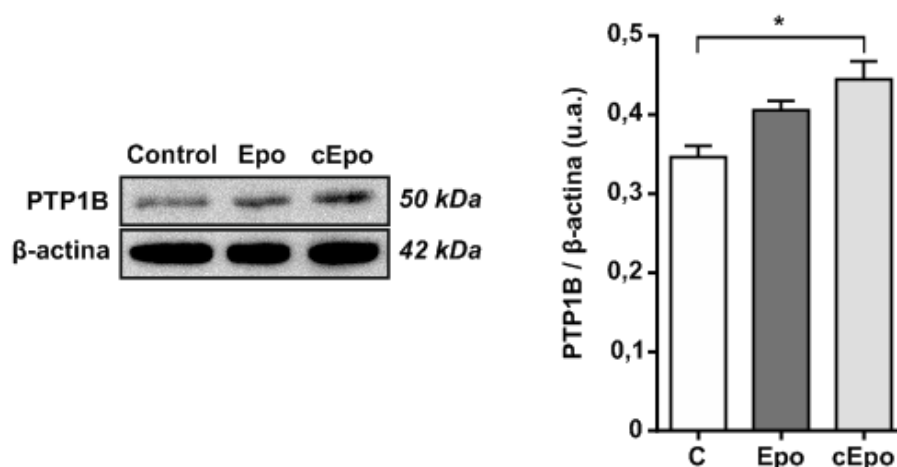


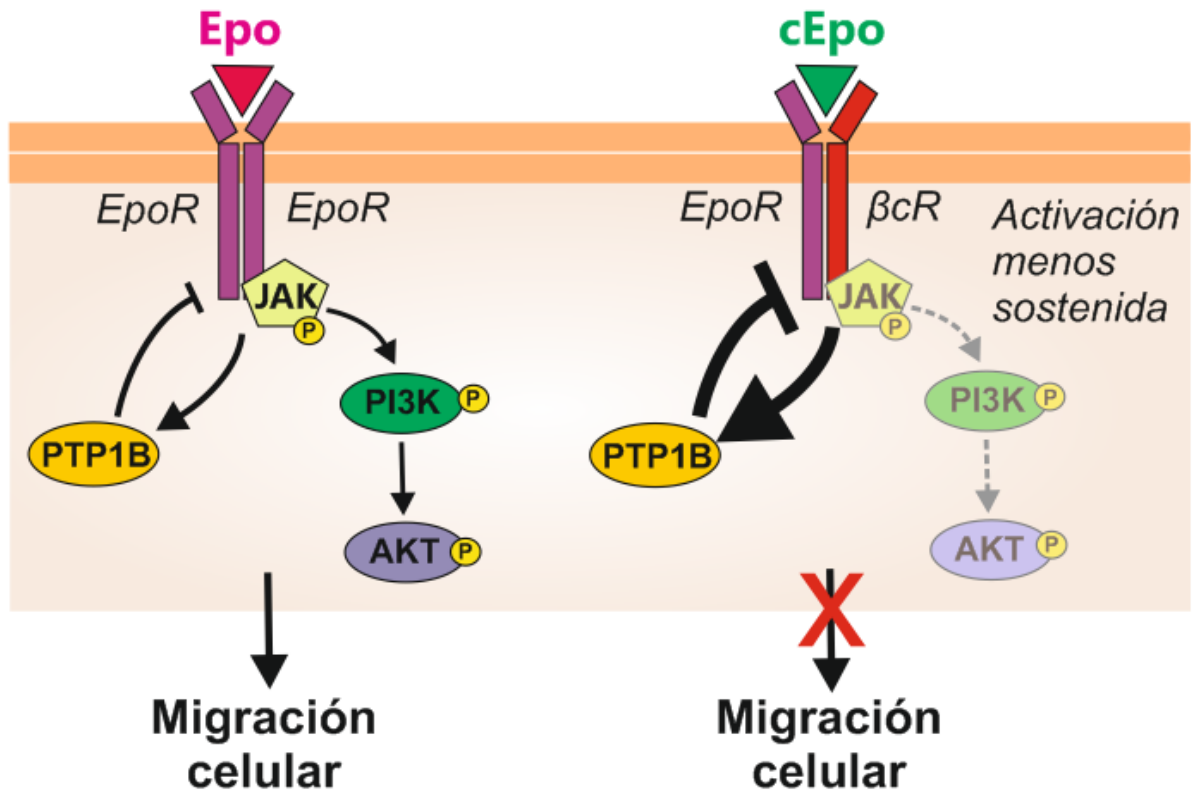
Figura 18. Expresión de PTP1B en células EA.hy926 tratadas con Epo o cEpo. Los niveles de proteína PTP1B tras 15 h de tratamiento con Epo o cEpo (200 ng/ml) fueron estudiados por SDS-PAGE y *Western blotting*. La inmunodetección se realizó por incubación con anticuerpos primarios anti-PTP1B y anti-β-actina, seguidos por los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa (HRP). Las bandas fueron visualizadas por quimioluminiscencia y cuantificadas por densitometría de bandas mediante el *software* ImageJ. Las barras representan media $\pm$ SEM de la densidad de bandas con respecto a β-actina, usada como control de siembra. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 3$.

II.4 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Las células endoteliales EA.hy926, así como las HUVEC y las HMEC-1, expresan el receptor de Epo (EpoR), y también la subunidad βcR que integra el heteroreceptor.
- Tal como ocurre en células del linaje eritroide, el efecto promigratorio de Epo en células endoteliales estaría mediado por el receptor homodimérico clásico EpoR-EpoR, y no por el heteroreceptor EpoR-βcR. Sin embargo, la competencia entre ambas eritropoyetinas por la subunidad EpoR altera la capacidad de Epo de estimular la migración celular.
- La subunidad EpoR también es requerida en el efecto promigratorio de VEGF.

- Si bien cEpo es capaz de estimular la activación de JAK2 y AKT, su imposibilidad de promover la migración endotelial se debería a una terminación prematura de la señal por PTP1B, como se ha reportado en células eritroides y como lo sugiere el aumento de la inducción de PTP1B por la eritropoyetina carbamilada.



Discusión Capítulo II

Los resultados obtenidos en este Capítulo sugieren que el efecto promigratorio de Epo en células endoteliales es mediado por la vía de señalización clásica activada por su unión al receptor homodimérico EpoR-EpoR, con la consiguiente activación de las quinasas JAK2 y PI3K (Fig. 11). Esto supone una diferencia con el paradigma reportado por algunos autores según el cual en tejidos no eritropoyéticos Epo actúa a través de su receptor alternativo EpoR- β -common.

Los experimentos confirman la expresión y la funcionalidad de la subunidad EpoR en células endoteliales de diverso origen (Figs. 8, 9 y 10), tal como ha sido anteriormente descrito tanto en cultivos celulares (Anagnostou et al., 1994; Ribatti et al., 1999) como en muestras de endotelio normal y tumoral (Yamaji et al., 1996; Miller et al., 2011). En línea con estos antecedentes, un trabajo de Trincavelli et al. (2013) muestra que el receptor de Epo no sólo es activado, sino que también está sujeto a desensibilización —con la consiguiente reducción de sus niveles de expresión— por diferentes compuestos derivados de Epo, tales como epoetina α , darbepoetina y CERA.

Por otro lado, la expresión de la subunidad β -common fue observada en cultivos de células HUVEC y en la línea celular endotelial ECV304, en respuesta a la incubación con GM-CSF (Colotta et al., 1993). En las células endoteliales analizadas en este trabajo (EA.hy926, HMEC-1 y HUVEC) se detectaron bajos niveles de expresión de β cR comparados con los observados para EpoR (Figs. 8 y 9). Este hallazgo concuerda con la explicación desarrollada por Coleman et al. (2006), según la cual el dímero EpoR-EpoR es la forma predominante del receptor de Epo en el endotelio diferenciado. De esta forma, el efecto diferencial de cEpo sobre la proliferación de células progenitoras endoteliales (EPCs) y células HUVEC es atribuido por los autores a diferentes patrones de expresión de β cR. De acuerdo con estas observaciones, Bennis et al. (2012) reportaron un efecto proangiogénico de Epo mediado por β cR en EPCs derivadas de sangre de cordón umbilical. Merece mencionarse que, aunque β cR no se encuentra altamente expresado en células EA.hy926, parece ser funcional, ya que fue capaz de mediar la actividad promigratoria de GM-CSF en ensayos de *wound healing* (Fig. 12).

De manera similar a lo descrito por Du et al. (2013) en células HUVEC, ensayos de *wound healing* en células EA.hy926 confirmaron la participación de EpoR en la migración de células endoteliales inducida por Epo, mediante silenciamiento transitorio por un siRNA (Fig. 10) y también por bloqueo del receptor con un anticuerpo específico (Fig. 11). De acuerdo con estos resultados, la inhibición de la quinasa asociada al receptor de Epo, JAK2, también impidió el efecto promigratorio de la citoquina.

Sin embargo, los experimentos realizados no apoyan la participación del receptor alternativo en la migración inducida por Epo. Si bien es aceptado que en tejidos no hematopoyéticos Epo actúa a través de su receptor alternativo, el bloqueo de β cR por un anticuerpo específico capaz de inhibir la señalización de GM-CSF en este tipo celular (Fig. 12) no impidió la migración en respuesta a Epo en células EA.hy926 ni en cultivos de células HUVEC (Fig. 11). Este resultado difiere de los obtenidos en células endoteliales de aorta bovina (BAECs) por Su et al. (2011), quienes reportaron la participación necesaria de la subunidad β cR en la capacidad de Epo de estimular la producción de NO, la proliferación, la migración celular y la formación de túbulos. Por otro lado, el receptor alternativo ha sido implicado en la producción de NO estimulada por Epo en células progenitoras endoteliales, así como también en la formación de un complejo con el receptor de VEGF tipo 2 (VEGFR2) en la promoción de la tubulogénesis (Sautina et al., 2010). Las diferencias halladas entre estos reportes y los resultados presentados en este Capítulo podrían deberse a la heterogeneidad interespecífica del endotelio y al ya mencionado patrón diferencial de expresión de β cR en células endoteliales maduras y progenitoras.

Para profundizar los conocimientos con respecto a la participación de ambos receptores, se realizaron ensayos de competencia entre cEpo y Epo (Fig. 13). Si bien a concentraciones equivalentes cEpo no interfirió con la capacidad de *wound healing* de la Epo nativa, un exceso (4X) del derivado carbamilado presentó un efecto inhibitorio, contradiciendo los resultados iniciales sobre la participación del receptor EpoR-EpoR y no del receptor alternativo, en la acción promigratoria de Epo. Una situación similar se observó en el tratamiento con VEGF, con lo cual se propuso buscar un elemento común a las vías de señalización de este factor y de Epo que pudiera ser afectado por la eritropoyetina carbamilada. En células endoteliales de la microvasculatura retiniana, Yang et al. (2014) determinaron que EpoR se asocia con el receptor VEGFR2, y que en su ausencia (*knock-down* por siRNA de EpoR), VEGF no es capaz de ejercer su efecto proangiogénico. A partir de este antecedente surgió la hipótesis de que, para la conformación del heteroreceptor, la subunidad EpoR es secuestrada por un exceso de cEpo, impidiendo la activación de células endoteliales por Epo y por VEGF. En línea con este interrogante, la actividad promigratoria de VEGF también fue inhibida por Epo (en ambas concentraciones ensayadas) y por un anticuerpo anti-EpoR (Fig. 14), sugiriendo que altas concentraciones de cEpo pueden afectar la disponibilidad de la subunidad EpoR y con ella, la capacidad de Epo y de VEGF de estimular la migración de células endoteliales. Sin embargo, debido a que la incubación con un exceso de cEpo también logró disminuir ligeramente la migración por SFB, no se puede descartar que este compuesto carbamilado pueda tener otros efectos en forma independiente a su relación con la subunidad EpoR.

La capacidad de cEpo de activar la señalización mediada por JAK2 y AKT fue reportada anteriormente por nuestro grupo de investigación en células eritroides de la línea UT-7

(Chamorro et al., 2013), en las cuales se observó un efecto menos sostenido en el tiempo con respecto al ejercido por Epo. En células endoteliales EA.hy926 también detectamos un patrón similar de activación de JAK2 y AKT por fosforilación (Figs. 15 y 16), efecto cuya magnitud no sólo fue menor que con Epo, sino que decayó más rápidamente. Si bien en la literatura no existen otros reportes sobre la capacidad de cEpo de estimular la fosforilación de estas quinasas en células endoteliales maduras, Ramírez et al. (2009) demostraron que tanto darbepoetina como darbepoetina carbamilada activan JAK2 y AKT en células progenitoras endoteliales.

La menor duración del efecto de cEpo sobre la fosforilación de JAK2 y AKT, así como su incapacidad de promover la migración de células endoteliales sugieren una terminación temprana de su señalización. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Callero et al., 2011) muestran que la unión de Epo a su receptor en células eritroides estimula la terminación de su propia señal, a través de la activación y el aumento de la expresión de la fosfatasa PTP1B. Posteriormente, el trabajo de Chamorro et al. (2015) demostró que la Epo carbamilada no sólo puede estimular la activación de JAK2 en el mismo tipo celular, sino que también induce la expresión y la actividad de PTP1B a niveles mayores que los alcanzados con la citoquina nativa. Este mecanismo de cierre prematuro de la señal sería, al menos parcialmente, responsable de la incapacidad de cEpo de estimular la proliferación de células UT-7 que hemos descrito anteriormente.

Diversos trabajos han implicado a PTP1B en la migración celular. Experimentos de silenciamiento y sobreexpresión han demostrado que PTP1B, como la fosfatasa asociada al receptor VEGFR2, es un regulador negativo de la angiogénesis inducida por VEGF, ya que inhibe la proliferación celular y estabiliza los contactos célula-célula (Lanahan et al., 2014; Nakamura et al., 2008). Los resultados aquí presentados en células EA.hy926 muestran que un tratamiento de 15 h con Epo estimula la expresión de PTP1B, la cual es inducida a niveles mayores por igual concentración de cEpo (Fig. 18). La inhibición de PTP1B por CinnGel 2Me permitió a cEpo superar su incapacidad de estimular la migración endotelial (Fig. 17), apoyando la hipótesis de que la ausencia de efecto promigratorio se debe a una terminación prematura de la señal.

En consonancia con lo reportado por Leist et al. (2004) acerca de la baja afinidad de cEpo por EpoR en ausencia de β cR, y con la imposibilidad de cEpo de estimular la motilidad de células endoteliales, los resultados presentados en este capítulo apoyan la participación del receptor EpoR-EpoR, y no del receptor alternativo, en el efecto promigratorio de Epo en este tipo celular. Por otro lado, la acción inhibitoria producida por altas concentraciones de cEpo frente a la motilidad celular inducida por Epo y VEGF, debida al secuestro de la subunidad EpoR, plantea interesantes perspectivas sobre su utilidad terapéutica como compuesto antiangiogénico.

CAPÍTULO III

Citoprotección y migración de células endoteliales por eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada. Participación de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico.

Tanto Epo como su derivado carbamilado son reconocidos por su actividad protectora frente al daño oxidativo, lo que ha despertado interés en su posible aplicación terapéutica en diversas patologías. Sin embargo, la participación de especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés: ROS, *Reactive Oxygen Species*) en el mecanismo de acción de factores proangiogénicos como VEGF ha sido reportada anteriormente (Wang et al., 2011).

Además de intervenir en la respuesta vasomotora del endotelio, el óxido nítrico (NO) es considerado un mediador del efecto proangiogénico de VEGF (Dimmeler et al., 2000). Sin embargo, existe controversia acerca de la capacidad de Epo de estimular la producción de óxido nítrico en células endoteliales, ya que diferentes autores han reportado efectos opuestos. Mientras que Epo es capaz de inducir la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la acumulación de NO en progenitores endoteliales (Sautina et al., 2010) y en células endoteliales maduras (Beleslin-Cokic et al., 2004), también se ha reportado que la citoquina estimula la acumulación de su inhibidor, la dimetilarginina asimétrica (ADMA) (Scalera et al., 2005).

Con el objetivo de ampliar el conocimiento acerca de los mecanismos de acción de Epo y cEpo en células endoteliales, se estudió su actividad protectora en condiciones prooxidantes, así como también su posible efecto generador de ROS y NO y el rol de estas especies químicas en la acción promigratoria de Epo.

III.1 Efecto citoprotector de Epo y cEpo en condiciones prooxidantes

En primer lugar, se evaluó la capacidad de ambas eritropoyetinas de prevenir la generación de especies reactivas nocivas para las células endoteliales.

III.1.1 Experimentos en células HUVEC

En pos de este objetivo, se realizaron ensayos preliminares con células HUVEC expuestas a un tratamiento oxidante consistente en H₂O₂ 50 µM y NaNO₂ 25 µM (45 min) y luego marcadas con

la sonda fluorescente DCFH-DA. Como se observa en la **Figura 19**, mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo se detectó un marcado aumento en los niveles intracelulares de ROS debido al tratamiento oxidante. La preincubación con Epo o cEpo (200 ng/mL, 1 h) logró una notable disminución en la carga intracelular de estas especies químicas, similar a la observada en el tratamiento con el antioxidante *N*-acetilcisteína (10 mM).

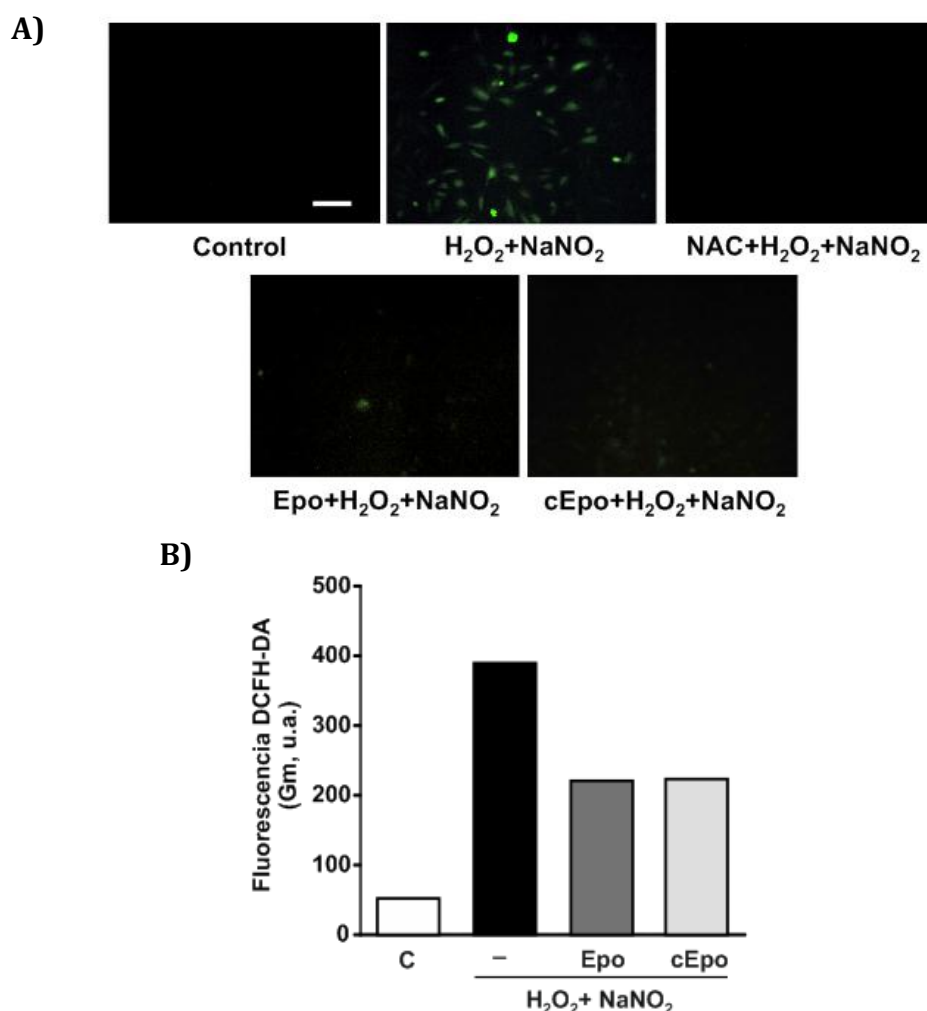


Figura 19. Actividad protectora de Epo y cEpo frente a tratamiento oxidante en células HUVEC. Las células fueron preincubadas con Epo o cEpo (200 ng/mL) o el compuesto antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC, 10 mM) por 1 h previo al tratamiento con H_2O_2 50 μ M + $NaNO_2$ 25 μ M (45 min), y la marcación con la sonda fluorescente DCFH-DA (3 μ M, 30 min). **A)** Las imágenes de microscopía de fluorescencia son representativas de 3 experimentos independientes (la línea blanca corresponde a 100 μ m). **B)** Los mismos tratamientos fueron analizados por citometría de flujo. Las barras muestran la media geométrica (*Geometric mean*, Gm) de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias.

Durante la optimización del experimento anterior, se observó que un tratamiento oxidante más agresivo resultaba en la pérdida de la integridad celular. Esto motivó el estudio de la capacidad de Epo y cEpo de prevenir la muerte celular inducida por agentes prooxidantes en células HUVEC. Para ello, los cultivos fueron sometidos a un tratamiento prooxidante más agresivo consistente en H_2O_2 1 mM y $NaNO_2$ 5 mM por 3 h. Con el fin de determinar apoptosis, las células

fueron, luego, marcadas con Anexina V-FITC, que permite la detección de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática, y con ioduro de propidio para detectar núcleos necróticos por citometría de flujo.

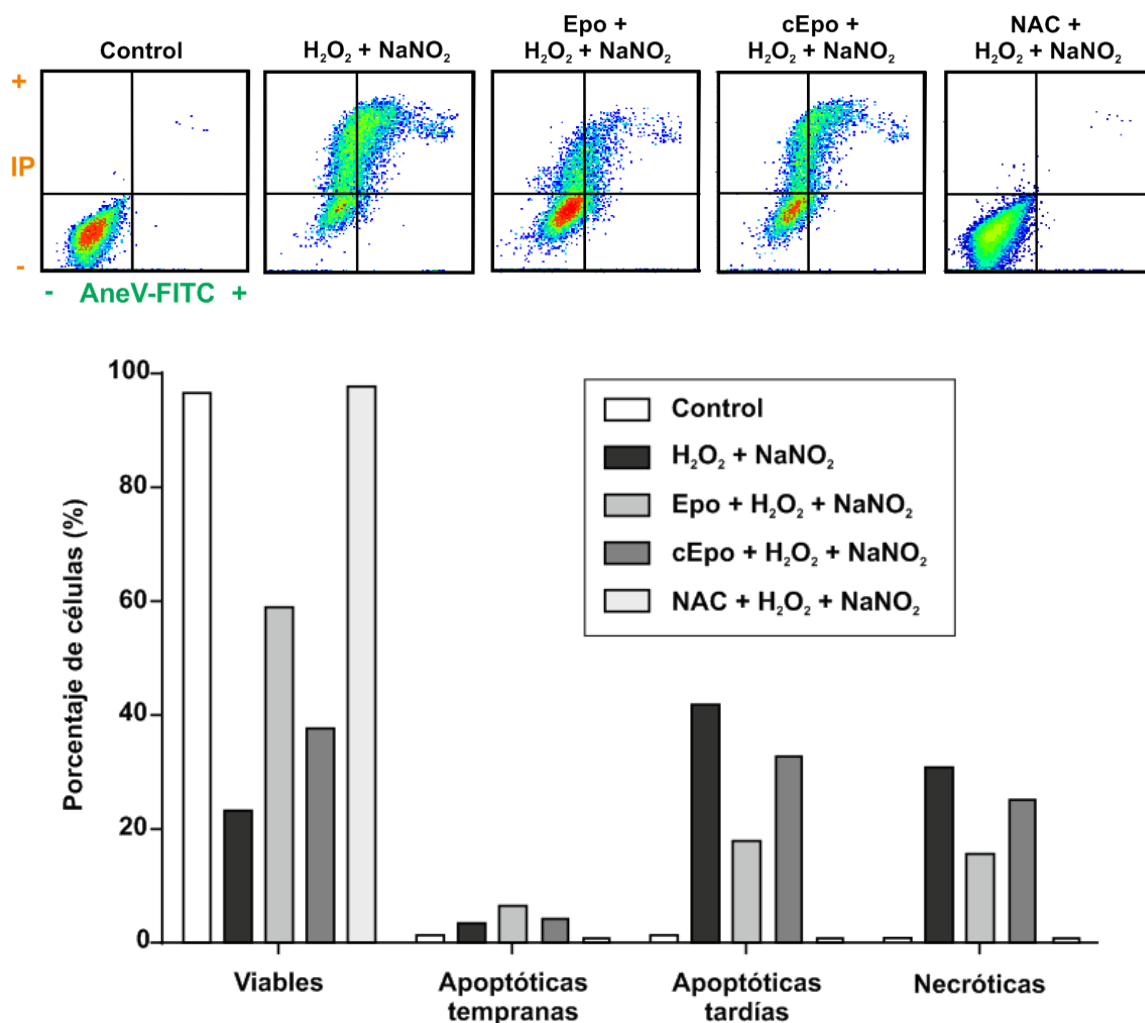


Figura 20. Efecto protector de Epo y cEpo en células HUVEC inducidas a muerte celular por agentes prooxidantes. Cultivos de células HUVEC fueron preincubados por 30 min con Epo, cEpo (200 ng/mL) o el compuesto antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC, 10 mM) y posteriormente tratados con H₂O₂ 1 mM + NaNO₂ 5 mM por 3 h. Tras la incubación, las células fueron recolectadas y se realizó una doble marcación con Anexina V-FITC / ioduro de propidio para el análisis de la apoptosis por citometría de flujo. Las barras representan el porcentaje sobre el total de células viables (AneV-/IP-), apoptóticas tempranas (AneV+/IP-), apoptóticas tardías (AneV+/IP+) y necróticas (AneV-/IP+) de un experimento. Los gráficos de citometría de flujo muestran la distribución de células en cada cuadrante por tratamiento.

Los cultivos expuestos al tratamiento oxidante mostraron una marcada disminución en el porcentaje de células viables, con un incremento en la proporción de células apoptóticas tardías (positivas para Anexina V-FITC y para ioduro de propidio) y necróticas (positivas para ioduro de propidio) con respecto al grupo experimental Control (**Figura 20**). Las células incubadas con Epo (200 ng/mL) 1 h antes del tratamiento oxidante mostraron un notable incremento en el porcentaje de células viables mientras que el pretratamiento con cEpo mostró menor

efectividad. El efecto protector máximo se obtuvo por incubación con el antioxidante *N*-acetilcisteína (10 mM), empleado como control.

Estos resultados muestran que el efecto preventivo de Epo y cEpo sobre la generación de ROS tiene consecuencias citoprotectoras relacionadas con la prevención de la apoptosis.

III.1.2 Experimentos en células EA.hy926

✦ *Acción de Epo y cEpo en un ambiente prooxidante generado por privación de SFB*

Los experimentos realizados posteriormente con células EA.hy926 permitieron corroborar la acción protectora de ambas eritropoyetinas frente a la generación de ROS intracelulares.

La **Figura 21** muestra que cultivos mantenidos en medio IMDM sin SFB por 15 h ven incrementado, en forma significativa, su contenido intracelular de ROS, de acuerdo con las determinaciones realizadas por citometría de flujo. El tratamiento de 15 h con Epo mostró un significativo efecto protector contra la generación de ROS, pero a diferencia de lo observado anteriormente en los ensayos de migración (Capítulo I), la disminución de los niveles de ROS fue más pronunciada a mayor concentración de Epo (400 ng/mL). El efecto protector fue menos marcado en el tratamiento con cEpo.

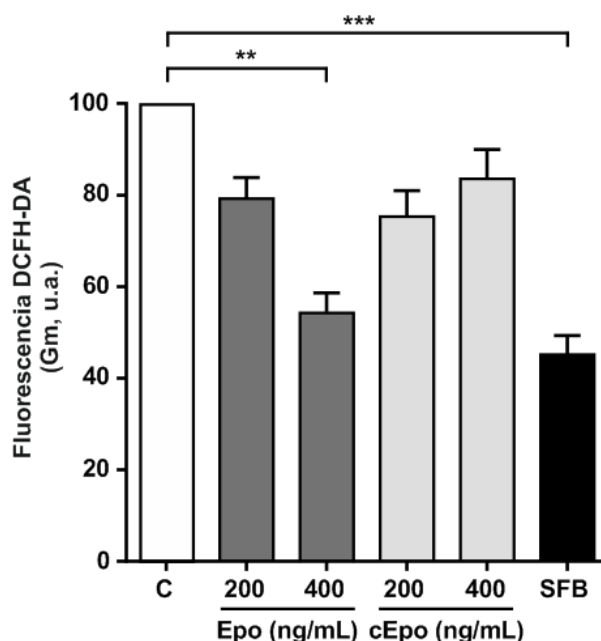


Figura 21. Efecto antioxidante de Epo y cEpo en células EA.hy926 frente a la privación de suero. Células EA.hy926 fueron expuestas a Epo o cEpo (200 y 400 ng/mL) por 15 h en medio sin SFB y luego incubadas con la sonda DCFH-DA (3 μ M, 30min). El contenido de ROS fue determinado por citometría de flujo. Se emplearon como controles células privadas de SFB durante todo el experimento (C) y células incubadas con SFB 10%. Las barras representan media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (*Geometric mean*, Gm) relativizada al Control. ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=5$.

✦ **Acción de Epo y cEpo en un ambiente prooxidante generado por peróxido de hidrógeno**

La preincubación con Epo también disminuyó significativamente los niveles intracelulares de ROS generados por incubación con peróxido de hidrógeno (100 μ M; **Figura 22**). Al igual que en el experimento anterior, donde la fuente de ROS fue la deprivación de SFB, el efecto de Epo fue más importante a una concentración de 400 ng/mL que a la de 200 ng/mL.

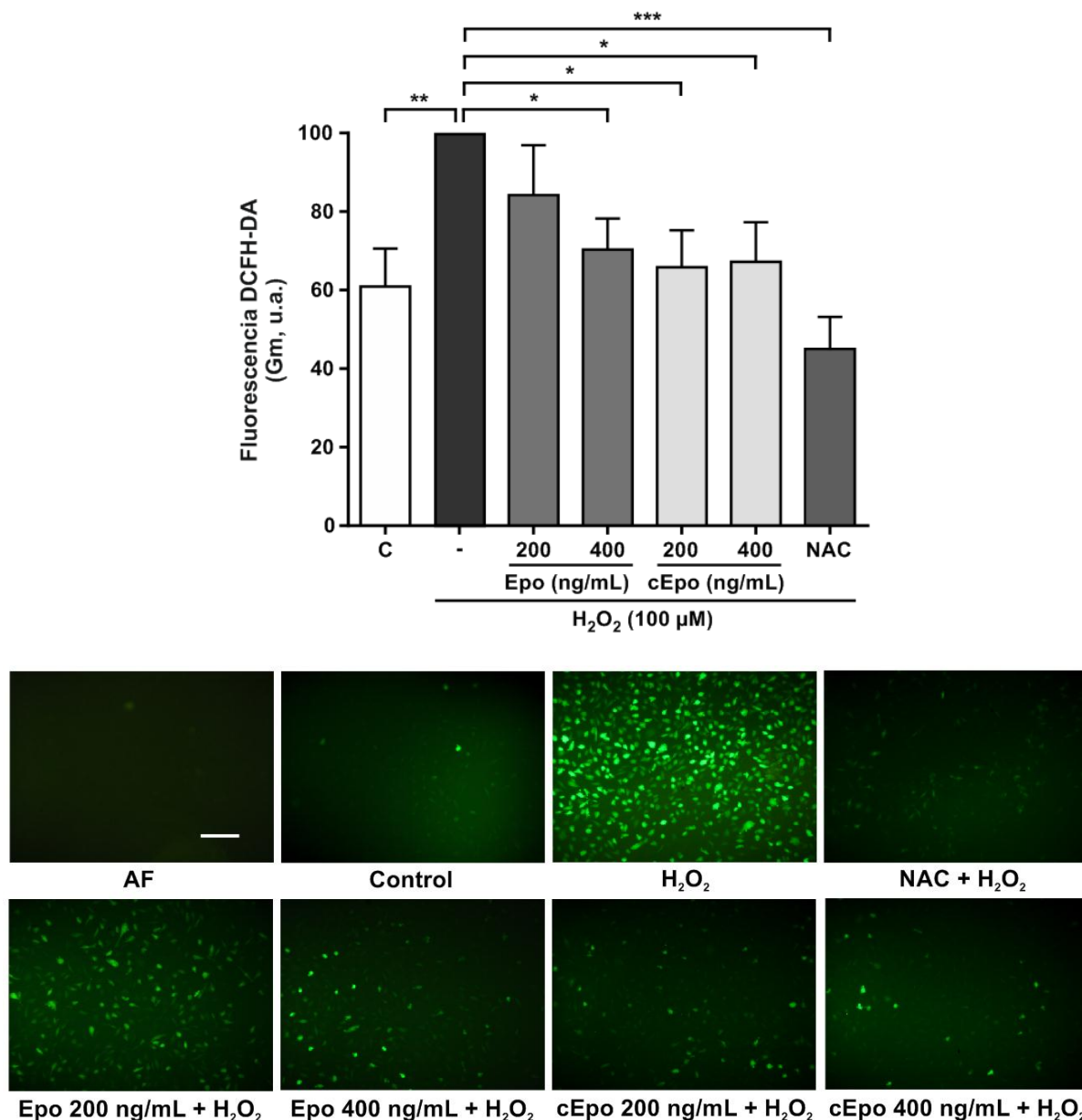


Figura 22. Efecto de Epo y cEpo frente a las especies reactivas generadas por exposición a H_2O_2 . Células EA.hy926 fueron preincubadas con el antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC, 10 mM), Epo o cEpo (200 and 400 ng/mL) por 1 h previo al tratamiento con H_2O_2 (100 μ M, 1 h). El contenido intracelular de ROS fue determinado por citometría de flujo tras incubación con la sonda DCFH-DA (3 μ M, 30 min). Las barras representan media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (*Geometric mean*, Gm) relativizada al tratamiento con H_2O_2 . * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 5$. Las imágenes de microscopía de fluorescencia son representativas de los tratamientos ensayados. La barra blanca representa 100 μ M.

Es importante resaltar que cEpo exhibió un marcado efecto protector frente al estado oxidante generado por H_2O_2 , a diferencia del efecto más leve frente a las ROS originadas por privación de SFB. La actividad protectora máxima se observó, en este caso, en la incubación con el antioxidante *N*-acetilcisteína.

III.2 Participación de especies reactivas de oxígeno en el efecto promigratorio de Epo

Los resultados obtenidos corroboran los reportes anteriores sobre el efecto protector de Epo y cEpo frente a la acumulación intracelular de ROS, si bien el derivado carbamylado fue menos efectivo en algunos casos. Sin embargo, diferentes autores proponen que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, en pequeñas concentraciones, juegan un rol importante en la motilidad de células endoteliales inducida por citoquinas.

Ante esta aparente contradicción, se consideró la posibilidad de que bajas concentraciones localizadas de estas especies químicas, generadas en una ventana temporal pequeña, puedan mediar la activación de la capacidad migratoria de células endoteliales.

III.2.1 Ensayos de migración en presencia de compuestos antioxidantes

Con el fin de poner a prueba la hipótesis mencionada y determinar si las ROS actúan como mediadores del efecto promigratorio de Epo, ensayos de *wound healing* fueron realizados en presencia del antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC).

Administrada sola, NAC tendió a reducir la capacidad de las células de moverse espontáneamente en ausencia de factores premigratorios. Sin embargo, su efecto inhibitorio fue significativamente mayor sobre la migración endotelial inducida por Epo, sugiriendo una posible contribución de esta citoquina a la generación de ROS. Este compuesto antioxidante también impidió la migración estimulada por VEGF y, en cierta medida, SFB 10%, (**Figura 23**).

Para corroborar la participación de ROS en la migración endotelial inducida por Epo, se realizaron ensayos de *wound healing* en presencia de ácido ascórbico como un agente antioxidante alternativo. Como se observa en la **Figura 24**, la incubación con este compuesto también tendió a inhibir, si bien con menor efectividad, la acción promigratoria de Epo y de VEGF en células EA.hy926, proporcionando evidencia adicional de la importancia de las especies reactivas de oxígeno en la actividad de estas citoquinas.

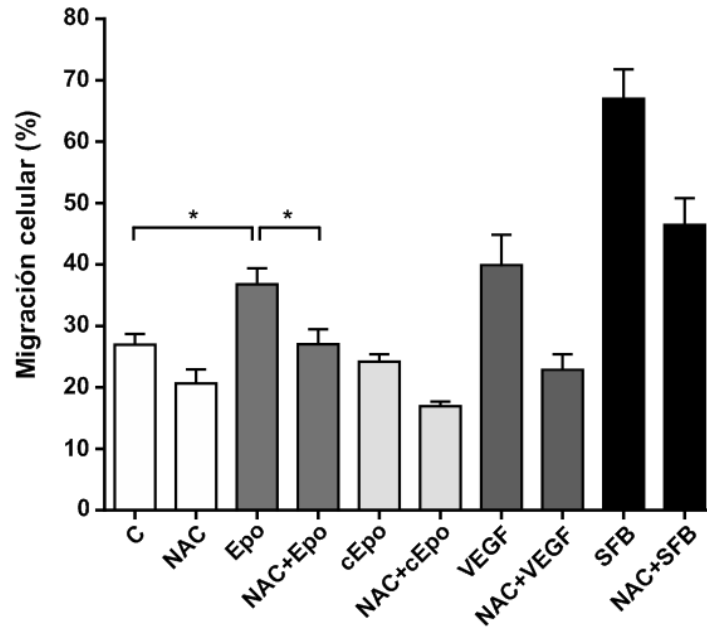


Figura 23. Migración de células EA.hy926 en presencia del antioxidante *N*-acetilcisteína (NAC). Ensayos de *wound healing* en células EA.hy926 tratadas con Epo o cEpo (200 ng/mL) y VEGF (10 ng/mL) durante 15 h tras una preincubación con NAC (5 mM, 10 min). Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB (10%). Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=9$.

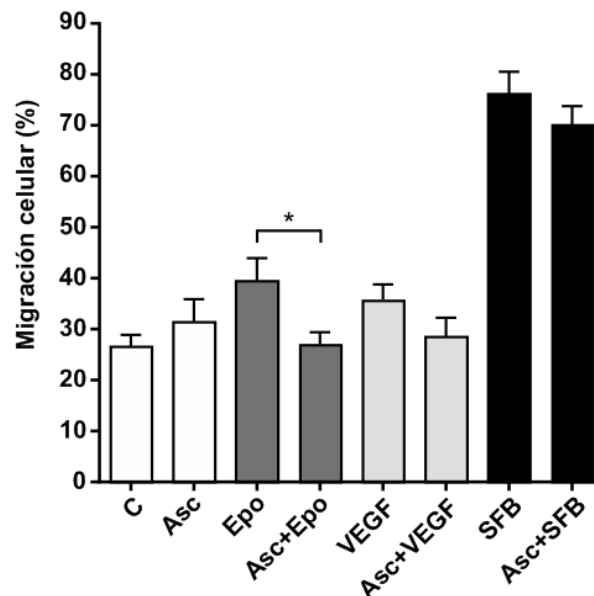


Figura 24. Migración de células EA.hy926 en presencia de ácido ascórbico. Ensayos de *wound healing* en células EA.hy926 tratadas con Epo (200 ng/mL) o VEGF (10 ng/mL) durante 15 h tras una preincubación con ácido ascórbico (1 μ M, 15 min). Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB (10%). Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=4$.

III.2.2 Generación de ROS por Epo y cEpo

Dado el efecto inhibitorio de compuestos antioxidantes sobre la migración endotelial inducida por Epo, el siguiente objetivo fue determinar la posible generación de ROS por esta citoquina en

células EA.hy926. Con ese fin se midieron los niveles intracelulares de estas entidades químicas a tiempos de incubación cortos (menores a 5 min) en presencia de Epo, cEpo o SFB, realizando citometría de flujo con la sonda fluorescente DCFH-DA.

La **Figura 25** muestra que Epo fue capaz de inducir un aumento transiente en los niveles intracelulares de ROS durante el primer minuto de exposición, alcanzando un máximo a los 30 s. El tratamiento con SFB dio lugar a un incremento más rápido, mientras que cEpo (200 ng/mL) no afectó los niveles citosólicos de ROS a ninguno de los tiempos de incubación estudiados.

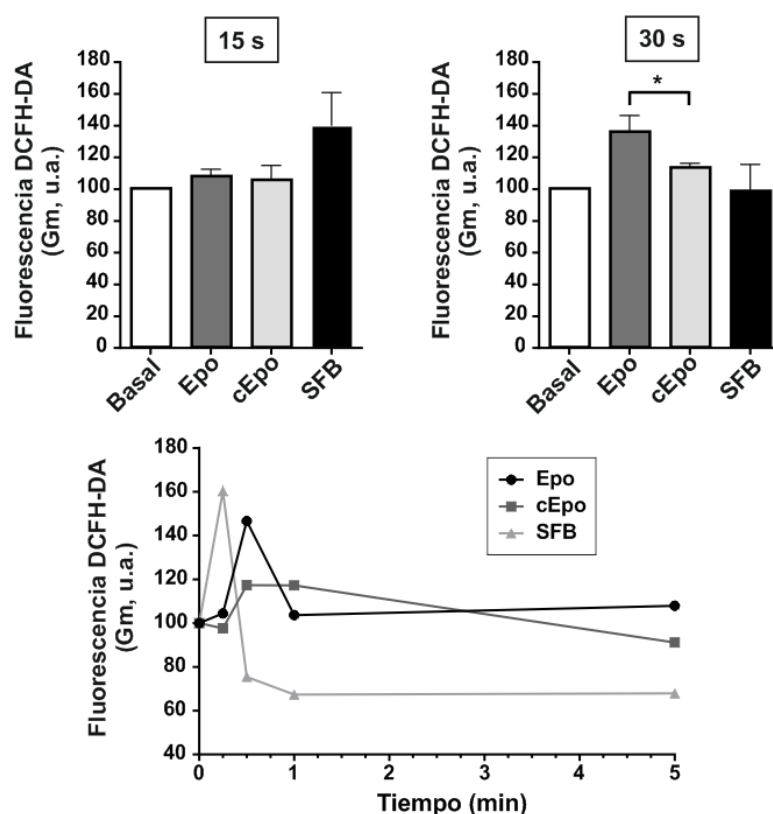


Figura 25. Generación de especies reactivas de oxígeno por Epo en células EA.hy925. Células EA.hy926 previamente marcadas con la sonda DCFH-DA (3 μ M, 30 min) fueron incubadas por los tiempos indicados con Epo (200 ng/mL), cEpo (200 ng/mL) o SFB 10% e inmediatamente fijadas con paraformaldehído a una concentración final de 0,5% para su posterior análisis por citometría de flujo. Las barras representan media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (*Geometric mean*, Gm) relativizada al tratamiento con H_2O_2 a 15 s y 30 s de tratamiento. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 4$. Se incluye un análisis representativo de citometría de flujo con datos registrados a $t = 0, 15$ s, 30 s, 1 min y 5 min.

III.3 Participación de óxido nítrico en el efecto promigratorio de Epo

Además de las especies reactivas de oxígeno, se ha demostrado la participación del óxido nítrico, generado por la óxido nítrico sintasa (NOS) en la angiogénesis inducida por VEGF (Fukumura et al., 2001). Para determinar la participación de este compuesto en el efecto promigratorio de Epo

se realizaron ensayos de migración por *wound healing* en presencia del inhibidor de NOS N^G-metil-L-arginina (L-NMMA). En presencia del inhibidor, la migración de células EA.hy926 se vio significativamente impedida, así como también la estimulada por VEGF, usado como control de la participación de NO (**Figura 26**). La migración inducida por SFB también se encontró parcialmente disminuida en presencia del inhibidor de eNOS.

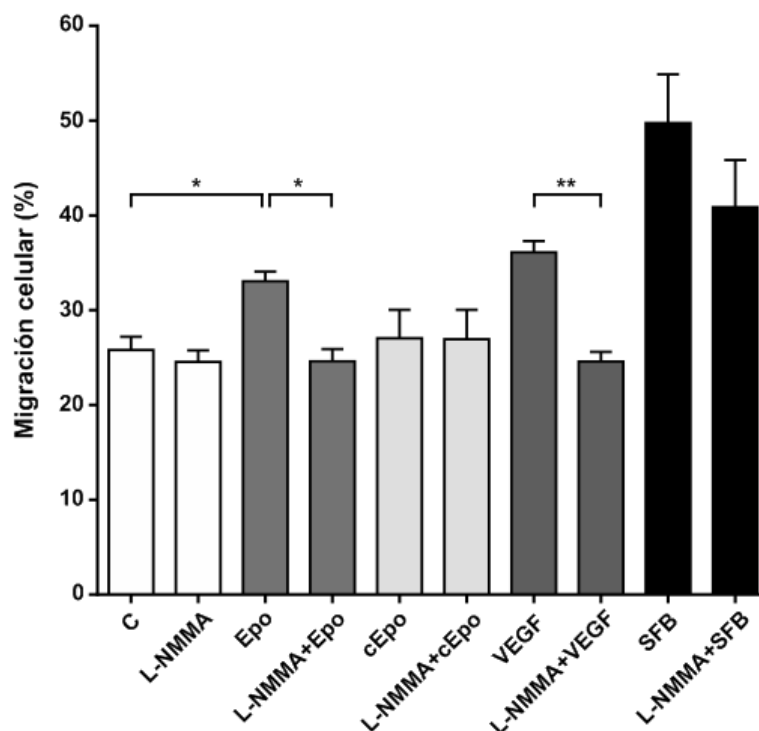


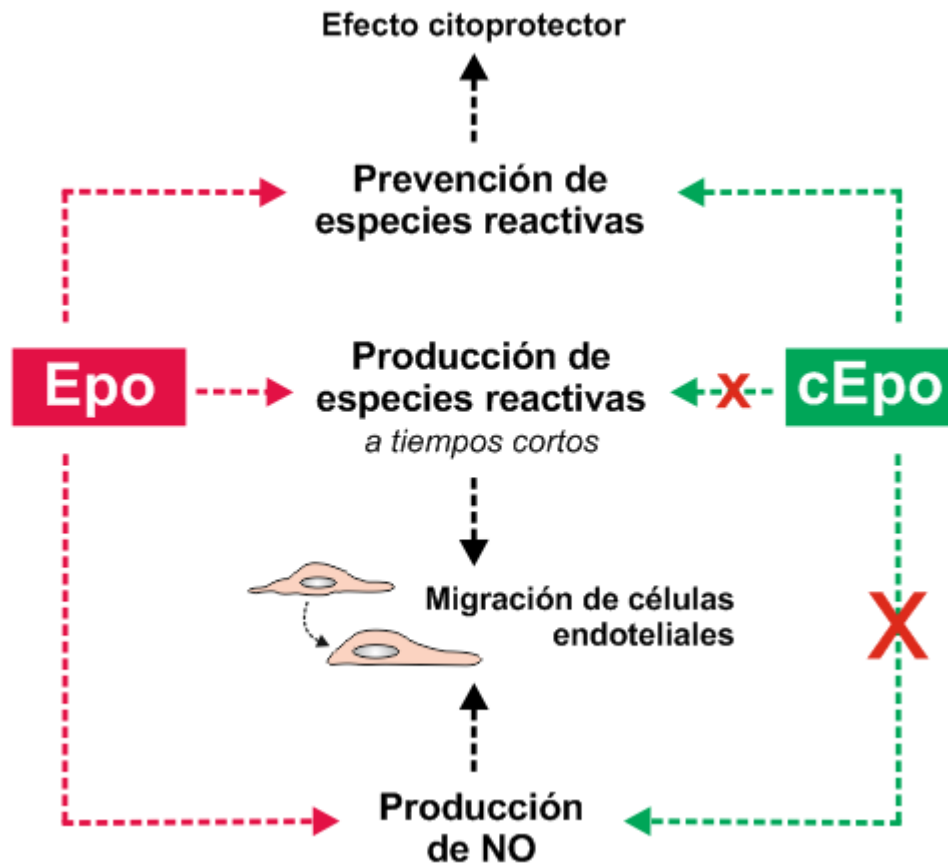
Figura 26. Participación de eNOS en la migración de células endoteliales. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926 preincubadas con L-NMMA (25 μ M, 30 min) previo al agregado de Epo (200 ng/mL), cEpo (200 ng/mL) o VEGF (10 ng/mL) durante 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 6$. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB (10%).

III.4 Conclusiones

De acuerdo con los resultados reportados en este Capítulo:

- Tanto Epo como cEpo previenen la acumulación de especies reactivas de oxígeno frente a diferentes tratamientos prooxidantes en cultivos de células endoteliales.
- Por otro lado, a tiempos breves de exposición, Epo es capaz de inducir el aumento de los niveles de ROS intracelulares, los que podrían estar involucrados en la activación de la capacidad migratoria de células endoteliales.
- El derivado no promigratorio, cEpo, no genera un incremento transiente de ROS.
- La migración de células endoteliales inducida tanto por Epo como por VEGF es inhibida por agentes antioxidantes como la *N*-acetilcisteína o el ácido ascórbico.

- Las 3 últimas conclusiones apoyan la participación de las especies reactivas de oxígeno en la migración endotelial.
- La producción de NO por la NOS endotelial representaría otro de los posibles mecanismos involucrados en el efecto proangiogénico de Epo.



Discusión Capítulo III

Los experimentos realizados muestran un comportamiento dual de la Epo con respecto a la generación de especies reactivas de oxígeno.

La capacidad antioxidante de Epo y sus derivados es reconocida en diferentes tipos celulares. El tratamiento *in vitro* de eritrocitos obtenidos de pacientes talasémicos incrementó sus niveles de glutatión y disminuyó la acumulación de ROS y la peroxidación de lípidos de membrana, reduciendo así el riesgo de hemólisis (Amer et al., 2010), mientras que una formulación intranasal de Epo impidió la peroxidación lipídica en hipocampo en un modelo de enfermedad de Alzheimer en roedores (Maurice et al., 2013). Por otra parte, De Beuf et al. (2010) reportaron un efecto citoprotector de las epoetinas alfa y delta frente al estrés oxidativo inducido por glucosa oxidasa en células primarias de túbulo renal humano obtenidas a partir de nefrectomías.

La función antioxidante de Epo como parte de su acción protectora en el sistema nervioso también ha sido demostrada en diferentes estudios. La incubación con darbepoetina suprimió el incremento de ROS generado por exposición a TNF- α en células endoteliales aórticas (Yang et al., 2011), mientras que Epo inhibió la producción de radicales superóxido en aorta de ratas hipertensas debido al tratamiento con el inhibidor de eNOS, L-NAME (Toba et al., 2012). El tratamiento con la citoquina también estimuló la expresión aórtica de la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) en ratones *wild type* (D'Uscio et al., 2010). Además, la delección del gen de SOD1 inhibió la capacidad de Epo de disminuir los niveles de superóxido, resaltando el rol de esta enzima en el efecto antioxidante de Epo en la vasculatura. En forma coincidente con estos reportes, los resultados de los experimentos que se muestran en este Capítulo confirman que Epo previene eficazmente la generación de ROS en células endoteliales HUVEC y EA.hy926 expuestas a diferentes tratamientos oxidantes (Figs. 19, 21 y 22).

Con el fin de profundizar el conocimiento sobre el potencial citoprotector de cEpo, cuya imposibilidad de estimular la eritropoyesis la convierte en un compuesto de interés clínico, diversos trabajos han evaluado su capacidad antioxidante. En un modelo *in vivo* de implantes renales (*renal grafts*) seguidos de isquemia/reperfusión en ratas, la administración de cEpo tanto a los animales donantes como a los receptores tuvo un marcado efecto citoprotector, asociado a un menor grado de nitrosilación de tirosinas —indicativa de la formación de peroxinitrito—, a una menor tasa de apoptosis tubular y a la preservación de la densidad capilar con respecto a parches isquémicos de animales no tratados (Cassis et al., 2011). Nuestros resultados muestran que la carbamilación de Epo no elimina su actividad antioxidante, si bien en algunos casos cEpo mostró ser menos efectiva en la prevención del aumento de ROS que la citoquina nativa (Figs. 21 y 22).

Por otro lado, en forma coincidente con el mencionado trabajo de Cassis et al., se observó que la capacidad antioxidante de Epo –y en menor medida, la de cEpo- estuvo asociada a la prevención de la apoptosis en células HUVEC (Fig. 20), lo que refuerza la potencialidad de ambos compuestos como agentes citoprotectores. Este resultado confirma el efecto antiapoptótico de Epo reportado anteriormente en neuronas del hipocampo sometidas a hipoxia química (Wen et al., 2002) y en miocardio isquémico (Burger et al., 2009), así como la acción de cEpo observada en cardiomiocitos (Moon et al., 2006), en progenitores endoteliales humanos (Ramírez et al., 2009) y en células neuronales de la línea SH-SY5Y (Chamorro et al., 2013).

Distintos autores han relacionado la acción antioxidante de Epo con la inducción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (Yang et al., 2011) y la catalasa (Guneli et al., 2007); sin embargo, se reportó que el tratamiento con cEpo no afectó la actividad de las mismas (Cassis et al., 2011). El estudio de la estructura molecular puede proporcionar explicaciones sobre la capacidad antioxidante de ambos compuestos. Chattopadhyay et al. (2000) sugirieron que la acción protectora de Epo contra el daño oxidativo podría deberse, al menos en parte, a la capacidad de sus residuos de carbohidratos, los cuales también se encuentran presentes en el derivado carbamilado, para actuar como *scavengers* de radicales libres. De esta forma, Epo parece contar con más de un mecanismo de acción antioxidante, lo que explicaría su mejor *performance* frente a cEpo en algunos ensayos. Con el fin de conocer la contribución estructural al efecto antioxidante de Epo y cEpo, sería interesante realizar un estudio comparativo con la neuropoetina (nEpo), un derivado de Epo que presenta un 40% menos ácido siálico (Mattio et al., 2011), o bien con el derivado desialilado asialoeritropoyetina (Imai et al., 1990), con baja actividad eritropoyética *in vivo* debido a su corta vida media.

Entre los posibles mecanismos responsables de la motilidad de células endoteliales, los experimentos fueron enfocados a determinar la participación de especies reactivas de oxígeno, dado que la generación de pequeñas cantidades localizadas de ROS ha sido previamente implicada en la respuesta migratoria de células estimuladas con citoquinas como VEGF (Wang et al., 2011). Se ha demostrado que entidades químicas como H₂O₂ son capaces de inactivar inhibidores de la migración celular, tales como la proteína tirosina fosfatasa PTP1B (Lee et al., 1998).

En ensayos de *wound healing* en células EA.hy926 se detectó una acción inhibitoria de los antioxidantes *N*-acetilcisteína (NAC, Fig. 23) y ácido ascórbico (Fig. 24) sobre la migración endotelial inducida por Epo o VEGF, sugiriendo una posible intervención de ROS en ese proceso. Por otro lado, los experimentos realizados mostraron que, tras 15 h de tratamiento, Epo disminuye los niveles intracelulares de ROS generados por privación de SFB.

Estas aparentes inconsistencias pueden explicarse por la generación rápida de ROS tras exposición a Epo (Fig. 25), también detectada en presencia de otro factor promigratorio como el

suelo. El incremento transitorio en los niveles de especies reactivas podría ser importante en el efecto promigratorio de Epo, siendo su efecto antioxidante el que predomina a tiempos de incubación más largos. Esto implicaría que las propiedades anti o prooxidantes de Epo dependen de la duración del tratamiento y también de la localización subcelular de las especies reactivas. Es importante resaltar que cEpo, que no ha demostrado tener efecto sobre la motilidad de células endoteliales, no generó aumento de ROS a tiempos cortos, lo cual aporta evidencia favorable a la participación de estas entidades en la migración.

La acción inhibitoria de NAC sobre la migración estimulada por Epo podría ser atribuida no solamente a su actividad antioxidante, sino también a un efecto directo de este compuesto sobre la expresión de metaloproteasas, la secreción de VEGF y la activación de diferentes vías de señalización en células endoteliales (Albini et al., 2001; Zafarullah et al., 2003). En forma similar, se ha descrito al ácido ascórbico (vitamina C) como un compuesto angiostático, debido a su acción inhibitoria de la producción de óxido nítrico (Mikirova et al., 2008).

El rol del óxido nítrico (NO) en el efecto de citoquinas proangiogénicas como VEGF ha sido documentado anteriormente, a través del estímulo de la proliferación de células endoteliales, la migración celular y la movilización de progenitores circulantes (Aicher et al., 2003; Fukumura et al., 2001). Se ha demostrado que la Epo no sólo estimula la síntesis de tetrahidrobiopterina (D'Uscio y Katusic, 2008), un cofactor esencial de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), sino que también es capaz de inducir la expresión de la enzima *in vivo* (Santhanam et al., 2006), su fosforilación y actividad medida a través de la producción de NO, tanto en progenitores endoteliales (Sautina et al., 2010) como en células endoteliales de aorta bovina (BAECs) (Su et al., 2011). Nuestros resultados muestran una reducción del cierre de la herida inducida tanto por Epo como por VEGF en células EA.hy926 tratadas con el inhibidor de NOS L-NMMA (Fig. 26). Este hallazgo no difiere del de Heikal et al. (2016), quienes reportaron un incremento de la migración endotelial por Epo en un contexto de hipoxia, explicándolo a través de la activación de eNOS y un aumento en la producción de NO. Estos resultados apoyan la hipótesis de la participación de NO en los mecanismos de acción de factores proangiogénicos.

En resumen, los hallazgos presentados en este Capítulo confirman el potencial citoprotector de Epo y de su derivado carbamilado, al tiempo que aportan información sobre el rol de especies reactivas de oxígeno y del óxido nítrico como mediadores del efecto promigratorio de Epo en células endoteliales.

CAPÍTULO IV

Participación de calcio y canales iónicos en la migración de células endoteliales inducida por eritropoyetina

Entre los diversos mecanismos que subyacen al proceso de migración celular se encuentra la participación del calcio (Giannone et al., 2004). Se ha descrito que incrementos transientes en la concentración citosólica de este catión estimulados por factores proangiogénicos activan la contracción necesaria para el despegado de la célula y el desensamble de adhesiones focales mediada por quinasas y fosfatasas calcio-dependientes (Lee et al., 1999). Estos hallazgos han despertado el interés por la posible contribución de canales de calcio en patologías relacionadas a la migración celular, tales como la metástasis y la proliferación vascular tumoral.

Considerando la importancia del calcio en la migración de diferentes tipos celulares, el objetivo de los ensayos mostrados en este Capítulo fue investigar la participación de ese catión y el posible rol de canales de calcio en el proceso angiogénico estimulado por Epo. Además, dado que la administración de Epo como compuesto proangiogénico podría ser beneficiosa en patologías como la isquemia coronaria (Buemi et al., 2002), se propuso investigar su acción en presencia de antagonistas de calcio, usados en la clínica como antihipertensivos, y en particular en el contexto de un ambiente proinflamatorio como el que caracteriza a la enfermedad cardiovascular.

IV.1 Participación del calcio en la migración celular

Como primer paso para estudiar la participación del calcio en el efecto promigratorio ejercido por Epo en células endoteliales, se realizaron ensayos de *wound healing* en presencia de los compuestos quelantes EDTA (con afinidad similar por Ca^{2+} y Mg^{2+}) y EGTA (con mayor afinidad por Ca^{2+}). Ambos compuestos fueron capaces de inhibir significativamente el aumento en la capacidad migratoria de células EA.hy926 tratadas con Epo durante 15 h (**Figura 27**), si bien no provocaron cambios notables en el efecto del SFB. Por otra parte, un efecto semejante al de los quelantes de Ca^{2+} se obtuvo por preincubación con calpeptina, un inhibidor sintético de la proteasa dependiente de calcio calpaína, cuya participación en el proceso migratorio está relacionada con el clivaje de las proteínas que componen las uniones focales (**Figura 28**).

Estos resultados sugieren al calcio como mediador del efecto de Epo sobre la motilidad de células endoteliales, con la intervención de proteasas activadas por este catión.

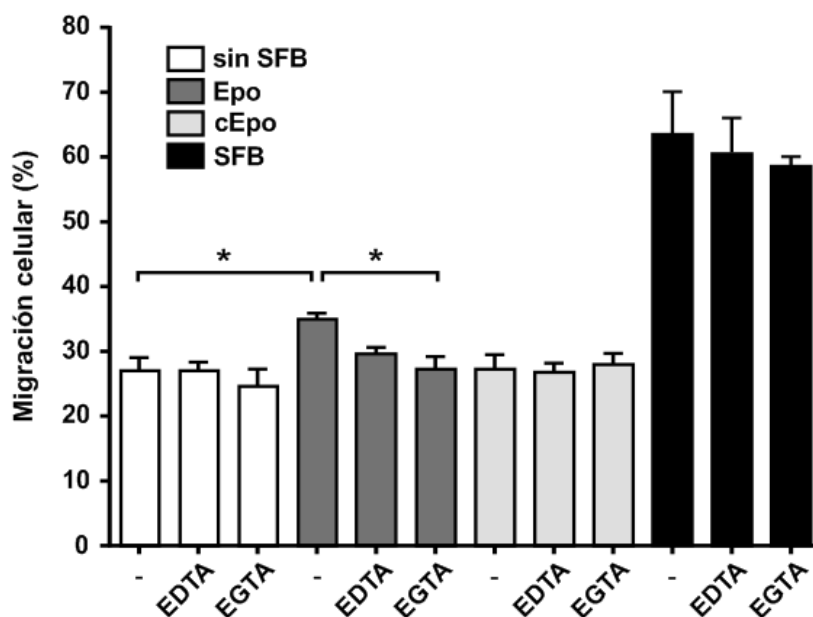


Figura 27. Participación de calcio en la migración inducida por Epo. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926 preincubadas con EDTA o EGTA (1 mM, 15 min) y luego tratadas con Epo o cEpo (200 ng/mL) por 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 4$.

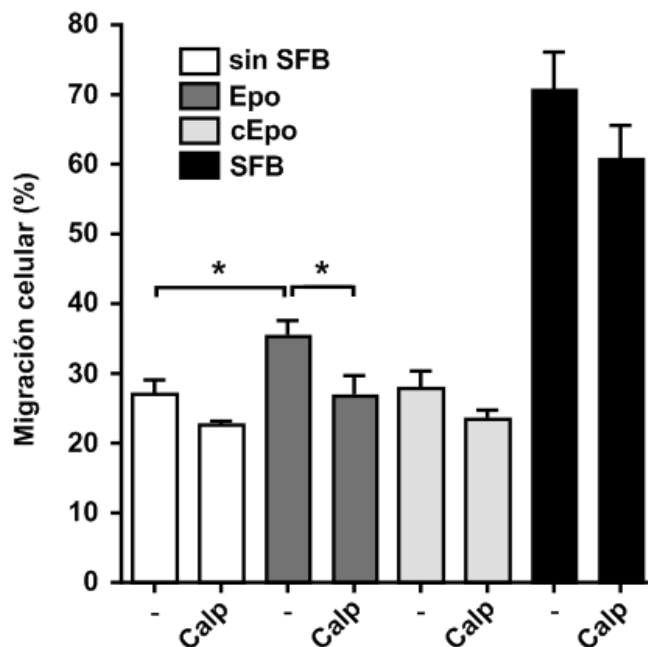


Figura 28. Participación de calpaína en la migración inducida por Epo. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926 preincubadas con calpeptina (1 mM, 15 min) y luego tratadas con Epo o cEpo (200 ng/mL) por 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%. * $P < 0,05$, ANOVA-Dunnet, $n = 5$.

IV.2 Efecto de Epo y cEpo sobre el calcio intracelular

A partir de los resultados anteriores, surgió un interrogante acerca de la capacidad de Epo de modificar los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Con el fin de aclarar este punto, se realizaron mediciones de Ca^{2+} intracelular por citometría de flujo en células EA.hy926 marcadas previamente con la sonda fluorescente Fluo 4-AM y luego expuestas a Epo o cEpo durante diferentes períodos.

Epo generó un incremento transiente de Ca^{2+} durante el primer minuto de incubación (**Figura 29**), alcanzando un pico a los 15 s de exposición, que no fue producido por igual concentración de cEpo, su derivado sin efecto promigratorio. Los ensayos realizados en *buffer* HEPES, tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} , permitieron evaluar el origen intra- o extracelular del catión durante el aumento transiente registrado. Dicho incremento no fue observado en el medio deprivado de Ca^{2+} , sugiriendo la entrada del catión desde el medio extracelular y no la salida desde depósitos intracelulares.

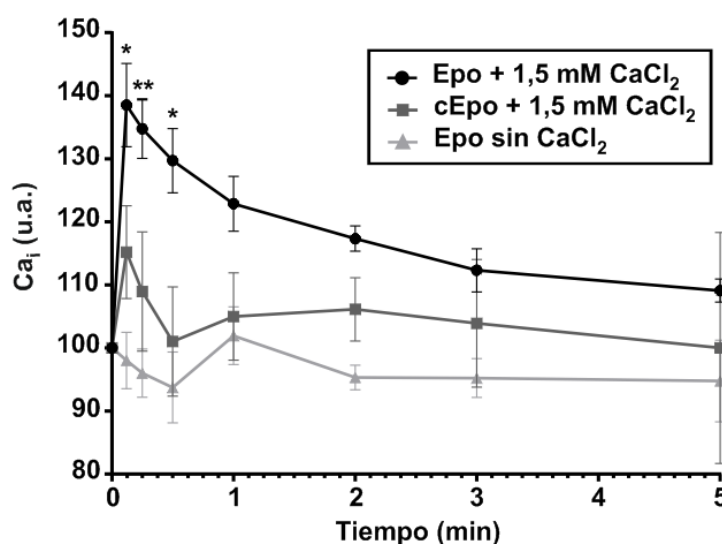


Figura 29. Dinámica del calcio intracelular (Ca_i) en respuesta a Epo y cEpo. Células EA.hy926 fueron cargadas con la sonda fluorescente Fluo 4-Am (3 μM ; 30 min), recolectadas y resuspendidas en *buffer* HEPES en presencia o ausencia de 1,5 mM Ca^{2+} . Las suspensiones celulares fueron tratadas por los tiempos correspondientes con Epo o cEpo (200 ng/mL) e inmediatamente fijadas con PFA a concentración final de 0,5% para la posterior adquisición de eventos por citometría de flujo. Cada punto de las curvas representa la media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (*Geometric mean*, Gm), relativizada a $t = 0$ (antes del agregado de Epo o cEpo). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 3$.

IV.3 Canales de calcio involucrados en el efecto proangiogénico de Epo

La demostración de la participación del Ca^{2+} en la migración endotelial inducida por Epo, que sugiere un influjo rápido a través de la membrana plasmática, motivó el estudio de la activación de canales de calcio. Para ello se realizaron experimentos en presencia de dos inhibidores farmacológicos de canales de calcio voltaje-dependientes, la amlodipina y el diltiazem, y un

anticuerpo bloqueador del canal transiente de calcio 3 (*Transient Potential Calcium Channel 3*, TRPC3).

IV.3.1 Actividad de canales de calcio en células endoteliales en respuesta a Epo

Experimentos de citometría de flujo en células EA.hy926 marcadas con la sonda Fluo 4-AM mostraron que una preincubación de 10 min con los inhibidores de canales de calcio dependientes de voltaje, amlodipina y diltiazem, o con un anticuerpo bloqueador de canales TRPC3 fue capaz de anular el aumento transiente de Ca^{2+} intracelular (a 15 s) estimulado por Epo (Figura 30).

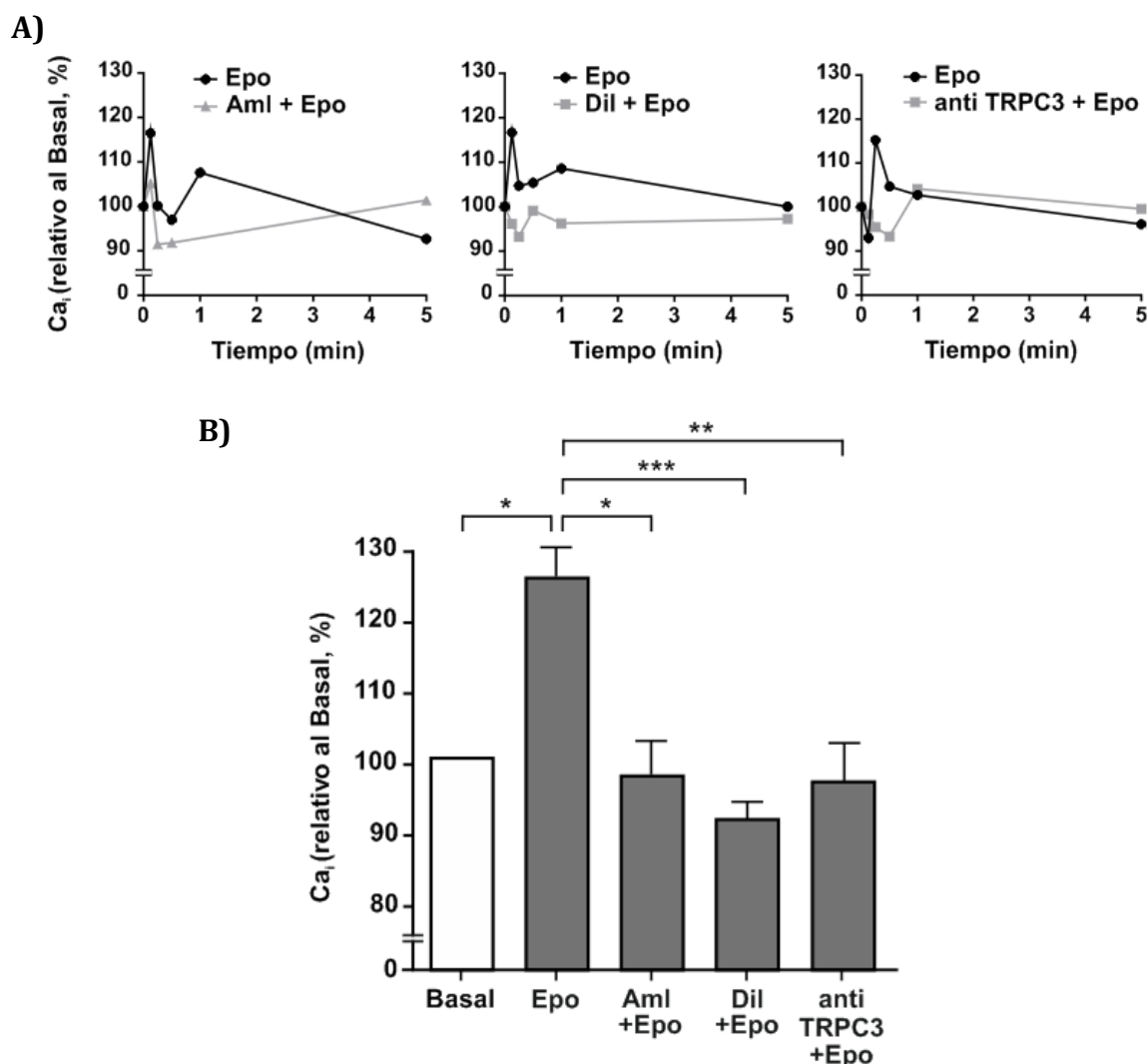


Figura 30. Efecto de amlodipina, diltiazem y anticuerpo anti-TRPC sobre el ingreso de calcio por Epo en células endoteliales. Células EA.hy926 fueron cargadas con la sonda fluorescente Fluo 4-Am (3 μM ; 30 min), recolectadas y resuspendidas en *buffer* HEPES en presencia de Ca^{2+} 1,5 mM. Las suspensiones celulares fueron tratadas por diferentes períodos con Epo (200 ng/mL) e inmediatamente fijadas con PFA a concentración final 0,5 % para el posterior análisis del calcio intracelular (Ca_i) por citometría de flujo. **A)** Los gráficos son representativos de los experimentos realizados. **B)** Las barras representan media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (*Geometric mean*, Gm) obtenida a t=15 s (correspondiente al máximo de Epo), relativa al basal (B). *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001, Kruskal Wallis-Dunn, n=8.

Este resultado no sólo confirma la capacidad de los inhibidores empleados para actuar como antagonistas de Ca^{2+} en células endoteliales, sino que además apoya la activación de canales transientes y canales dependientes de voltaje por Epo en este tipo celular, con el consecuente influjo de Ca^{2+} .

IV.3.2 Participación de canales de calcio en la angiogénesis inducida por Epo.

Debido a la importancia del calcio en el efecto promigratorio de Epo en células endoteliales, demostrada en experimentos con EGTA y EDTA, así como la capacidad de amlodipina, diltiazem y el anticuerpo bloqueador de TRPC3 de inhibir el influjo de Ca^{2+} por Epo en este tipo celular, el siguiente objetivo fue estudiar el posible rol de canales de calcio transientes y operados por voltaje en el proceso angiogénico estimulado por esta citoquina.

IV.3.2.a Canales de tipo TRPC

La inhibición de canales TRPC3 por un anticuerpo bloqueador impidió el aumento transiente de calcio intracelular inducido por Epo (Figura 30), a partir de lo cual se decidió estudiar la participación de estos canales en la migración de células endoteliales estimulada por la citoquina. El efecto promigratorio de Epo fue significativamente inhibido por incubación con el anticuerpo anti-TRPC3 (**Figura 31**), confirmando la participación de este tipo de canal en la acción de esta citoquina sobre células endoteliales.

De manera consistente con la capacidad de Epo de actuar sobre canales transientes de Ca^{2+} en la inducción de un comportamiento migratorio, el estudio de los niveles de expresión de TRPC3 por citometría de flujo mostró un incremento significativo de estos canales tras una incubación de 15 h con Epo, mientras que los niveles de canales TRPC6, analizados con fines comparativos, no se vieron modificados (**Figura 32**).

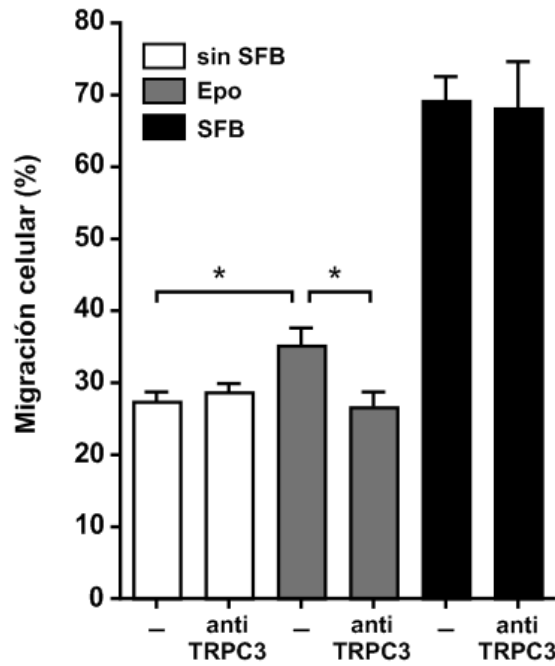


Figura 31. Efecto del bloqueo de canales TRPC3 en la migración de células endoteliales inducida por Epo. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926 en presencia de Epo (200 ng/mL por 15 h), tras una preincubación con anticuerpo anti TRPC3 (10 min, 400 ng/mL). Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 8$. Controles: Cultivos sin SFB (C) y con SFB (10%).

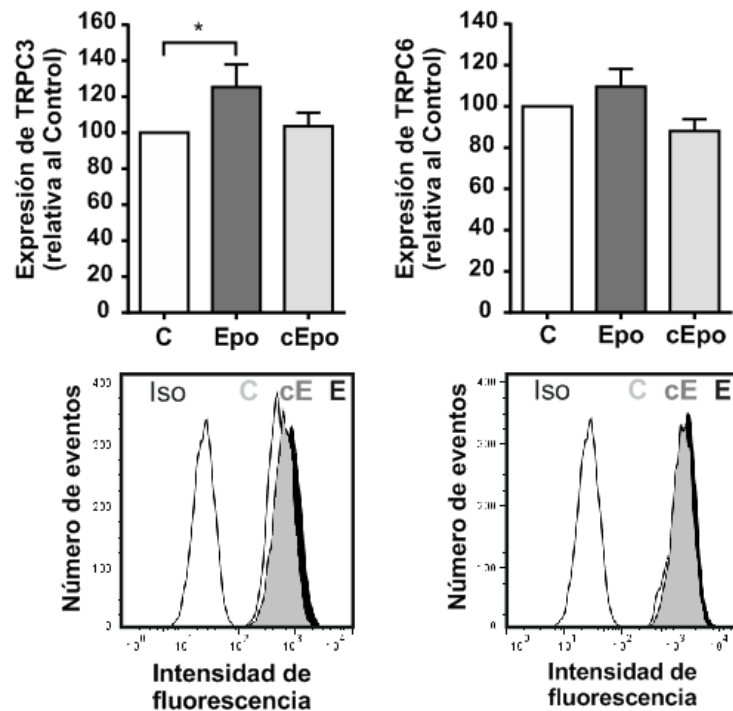


Figura 32. Efecto de Epo y cEpo sobre la expresión de TRPC3 y TRPC6 en células EA.hy926. Células EA.hy926 fueron tratadas con Epo o cEpo (200 ng/mL) por 15 h, fijadas y marcadas con anticuerpos primarios contra TRPC3 o TRPC6 y luego con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488, previo a la adquisición de eventos por citometría de flujo. Las barras representan media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (*Geometric mean, Gm*) de cada tratamiento, expresada en unidades arbitrarias. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 5$. Se incluyen gráficos representativos de citometría de flujo.

IV.3.2.b Participación de canales de potasio

En células endoteliales se ha reportado que los canales TRPC permiten influjos de Ca^{2+} en respuesta a la hiperpolarización de membrana debida a la activación de canales de potasio. Estos canales de K^+ inducidos por Ca^{2+} responden a leves aumentos en los niveles citosólicos de Ca^{2+} generados por la apertura de reservorios intracelulares inducida por la activación de receptores de membrana. En base a esto, para completar el estudio de la participación de Ca^{2+} como mediador de Epo en células endoteliales, se investigó la colaboración de canales de Ca^{2+} y K^+ en el influjo de Ca^{2+} , empleando quinina como antagonista de K^+ .

La inhibición de canales de K^+ por quinina impidió el aumento del calcio citosólico causado por Epo en células EA.hy926 (Figura 33).

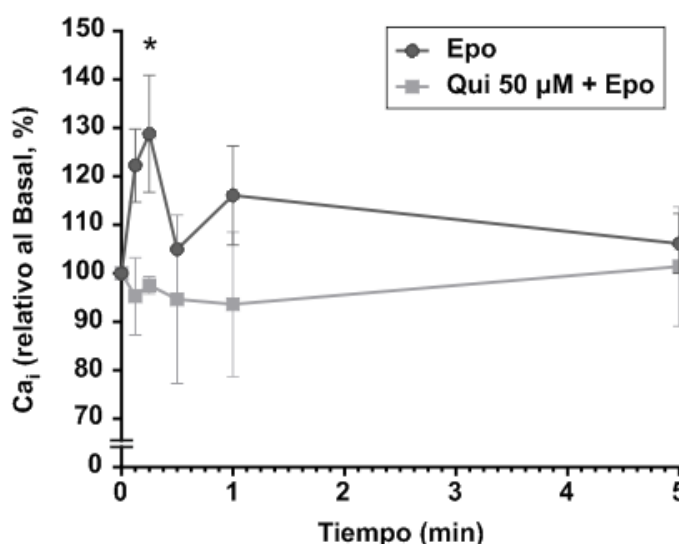


Figura 33. Efecto de Epo sobre el calcio intracelular (Ca_i) en presencia de un inhibidor de canales de potasio. Células EA.hy926 fueron cargadas con la sonda fluorescente Fluo 4-Am ($3 \mu\text{M}$; 30 min), recolectadas y resuspendidas en *buffer* HEPES con 1.5 mM Ca^{2+} . Las suspensiones celulares fueron tratadas por los tiempos correspondientes con Epo (200 ng/mL) en ausencia o presencia de quinina ($50 \mu\text{M}$) e inmediatamente fijadas con PFA a concentración final de 0.5% para la posterior adquisición de eventos por citometría de flujo. Cada punto de las curvas representa media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (*Geometric mean*, Gm) de cada tratamiento, relativa a $t = 0$. * $P < 0.05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=3$.

En forma coincidente, la quinina también inhibió la migración de células EA.hy926 inducida por Epo, y en menor medida también por SFB (10%), en ensayos de *wound healing* (Figura 34). Estos resultados apoyan la participación de mecanismos de entrada de calcio en la respuesta celular a Epo.

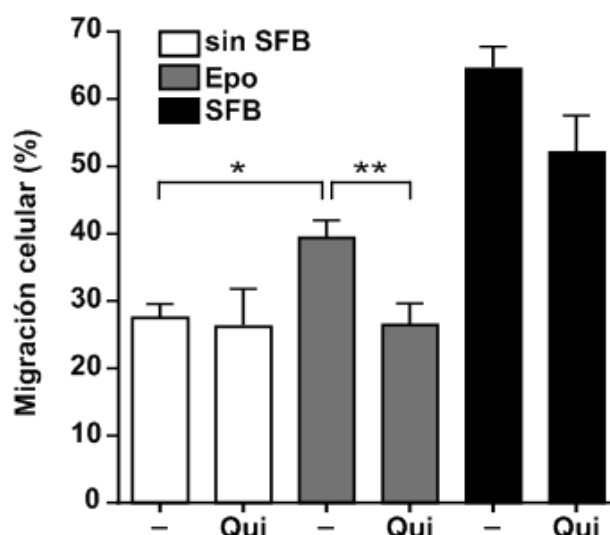


Figura 34. Acción de quinina en la migración de células endoteliales inducida por Epo. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926 preincubadas con quinina (50 μ M, 10 min) y luego tratadas con Epo (200 ng/mL) por 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB (10%). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 7$.

IV.3.2.c Canales dependientes de voltaje

Debido a sus efectos sobre el tono vascular, los antagonistas de Ca^{2+} se prescriben a pacientes hipertensos, particularmente a aquéllos que sufren de comorbilidades tales como asma, diabetes mellitus, angina pectoris o enfermedad vascular periférica. En base a esto, se realizaron experimentos a fin de determinar la contribución de diferentes tipos de canales y sus inhibidores al proceso angiogénico estimulado por Epo, lo que podría representar tanto una ventaja terapéutica como un efecto indeseado en ciertas patologías.

✦ Migración celular en presencia de antagonistas de calcio de uso clínico

En ensayos de migración por *wound healing* en células EA.hy926, la preincubación con amlodipina fue capaz de inhibir el efecto de los factores promigratorios Epo y VEGF (**Figura 35**). En forma similar a lo observado en la coincubación con los quelantes EDTA y EGTA (Figura 27), la acción del SFB sobre la motilidad celular parece no depender fuertemente del influjo de Ca^{2+} , ya que la inhibición farmacológica por amlodipina no provocó cambios significativos. Por otro lado, diltiazem no exhibió efecto inhibitorio de la migración endotelial frente a ninguno de los dos inductores empleados: Epo y VEGF (**Figura 36**).

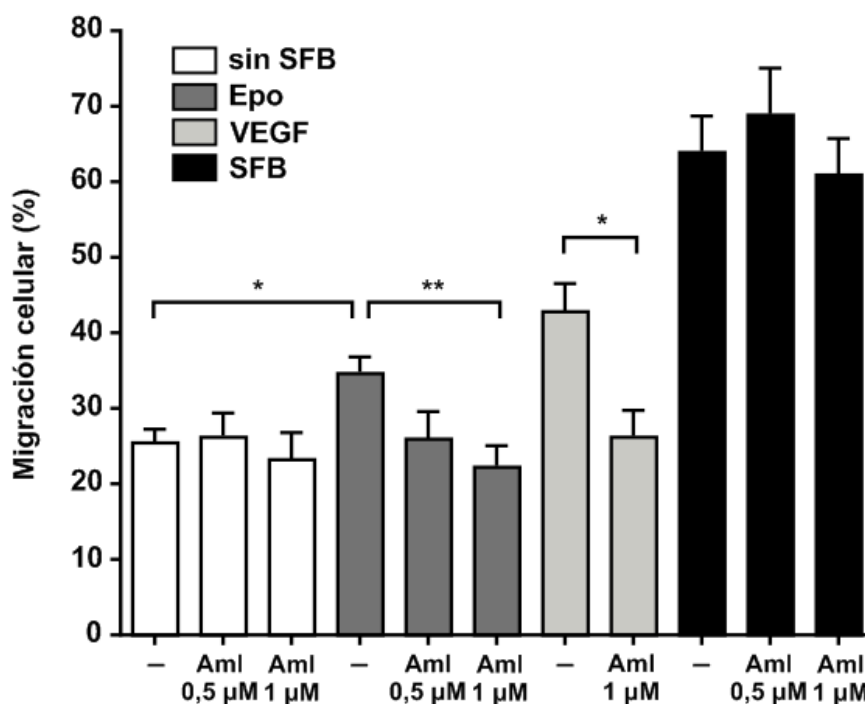


Figura 35. Efecto de amlodipina en la migración endotelial inducida por Epo y por VEGF. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926 preincubadas con amlodipina (0,5 y 1 μ M, 10 min) y posteriormente tratadas con Epo (200 ng/mL) o VEGF (10 ng/mL) por 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 13$. Controles: cultivos sin SFB (condición control) y con SFB (10%).

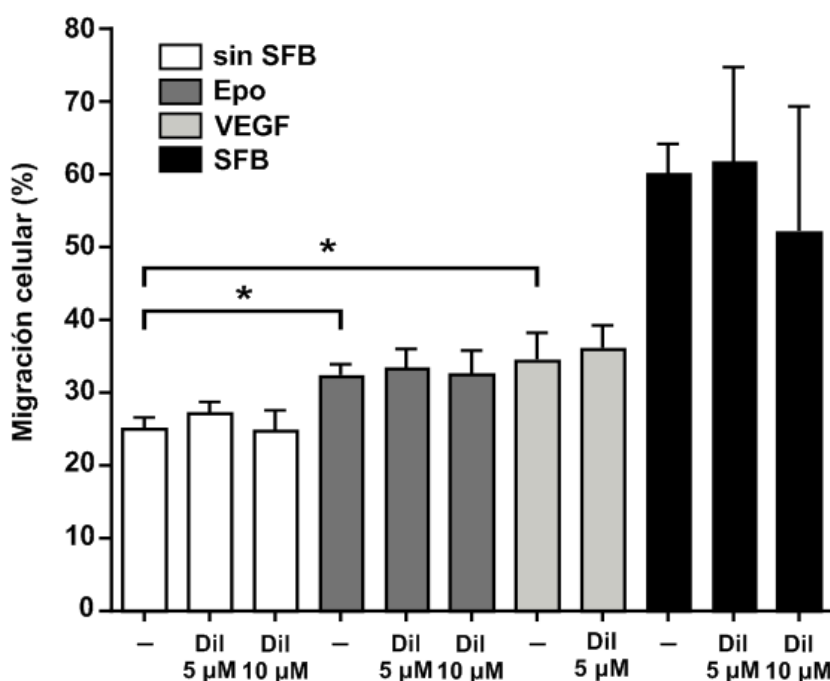


Figura 36. Efecto de diltiazem en la migración endotelial inducida por Epo y por VEGF. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926 preincubadas con diltiazem (5 y 10 μ M, 10 min) y posteriormente tratadas con Epo (200 ng/mL) o VEGF (10 ng/mL) por 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 9$. Controles: cultivos sin SFB (condición control) y con SFB (10%).

Este fue un resultado inesperado, ya que anteriormente se demostró la capacidad de este compuesto de impedir el influjo de Ca^{2+} en respuesta a Epo en este tipo celular. Para confirmarlo, se realizaron ensayos de *wound healing* en células HUVEC expuestas a Epo en presencia de amlodipina y diltiazem. Al igual que en las células EA.hy926, en células HUVEC amlodipina inhibió la actividad promigratoria de Epo, mientras que no se observó efecto de diltiazem (Figura 37).

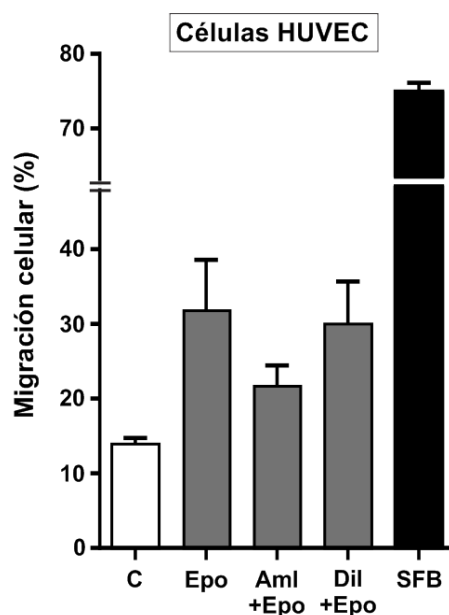


Figura 37. Efecto de amlodipina y diltiazem en la migración de células HUVEC inducida por Epo y por VEGF. Ensayo de *wound healing* en células HUVEC preincubadas con amlodipina (1 μM) o diltiazem (5 μM), 10 min y posteriormente tratadas con Epo (200 ng/mL) por 24 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular ($n=3$). Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB (2%).

✦ Tubulogénesis en presencia de antagonistas de calcio de uso clínico

Para completar la evaluación de los efectos de antagonistas de calcio sobre la angiogénesis, se realizaron ensayos de formación de túbulos endoteliales sobre un sustrato similar matriz extracelular, ya que esta técnica integra los diferentes pasos del proceso angiogénico, tales como migración, invasión, secreción de metaloproteasas y formación de estructuras capilares.

La **Figura 38** muestra imágenes representativas de las estructuras tubulares formadas por células endoteliales expuestas a amlodipina y diltiazem, empleando Epo como factor inductor de la tubulogénesis, y SFB (2%) como control positivo.

En forma coincidente con lo observado en los ensayos de *wound healing*, Epo estimuló el engrosamiento de los túbulos generados en forma basal en ausencia de SFB. Amlodipina inhibió significativamente la tubulogénesis estimulada por Epo, mientras que diltiazem no interfirió con este efecto. El cálculo del índice angiogénico a partir de las microfotografías tomadas para cada

tratamiento reveló que la coincubación con amlodipina hizo disminuir significativamente el valor obtenido con Epo, mientras que diltiazem no modificó este parámetro de la citoquina.

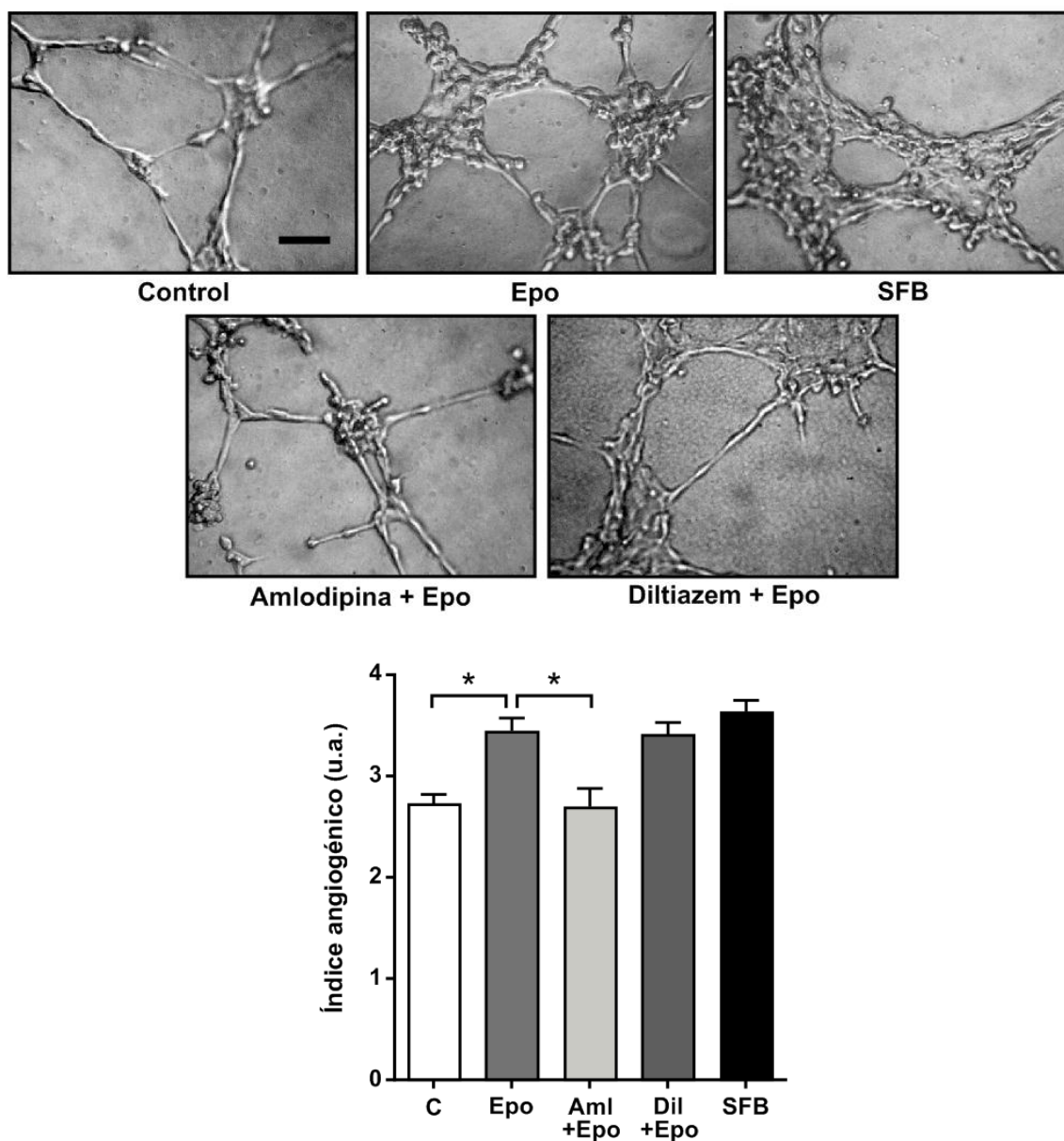


Figura 38. Efecto de amlodipina y diltiazem en la formación de túbulos inducida por Epo. Células EA.hy926 fueron sembradas en *wells* de microplaca de 96 pocillos sobre una matriz similar membrana basal (Geltrex, Gibco), pretratadas (10 min) con amlodipina (1 μM) o diltiazem (5 μM) y luego incubadas con Epo (200 ng/mL) por 24 h. La formación de estructuras tubulares se cuantificó mediante el cálculo de un índice angiogénico (Ecuación I, Materiales y Métodos), a partir de 10 fotografías tomadas a tiempo final para cada tratamiento. Las barras representan media ± SEM del índice angiogénico calculado para cada uno de los tratamientos. *P<0,05, Kruskal Wallis-Dunn, n=5. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 2%. Se incluyen fotografías representativas de los diferentes tratamientos (la línea negra representa 100 μm).

La **Figura 39** resume en forma gráfica los resultados obtenidos en los ensayos de *wound healing* en células EA.hy926 con Epo como inductor de la migración en presencia de los antagonistas de calcio amlodipina, diltiazem y anticuerpo anti TRPC3.

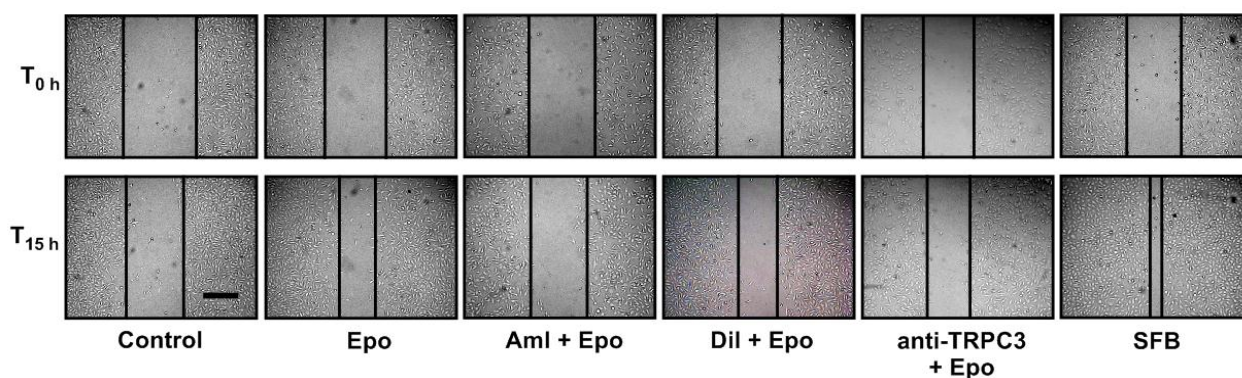


Figura 39. Ensayo de wound healing en presencia de antagonistas de calcio en células EA.hy926. Imágenes representativas de los tratamientos ensayados durante 15 h. Epo: 200 ng/mL, amlodipina: 1 μ M, diltiazem: 5 μ M y anticuerpo contra TRPC3: 400 ng/mL. Controles: cultivos mantenidos en IMDM sin SFB y células con SFB (10%). La barra negra representa 500 μ m.

En conjunto, estos resultados enfatizan la importancia de la entrada de Ca^{2+} en células endoteliales expuestas a estímulos proangiogénicos, y proveen evidencia de la participación de canales transientes y operados por voltaje en el proceso migratorio. Sin embargo, se detectó un efecto diferencial de la amlodipina y el diltiazem sobre la motilidad celular, pese a la capacidad de ambos de bloquear el influjo de calcio.

IV.3.3 Mecanismos de acción diferencial de amlodipina y diltiazem: generación de ROS.

A partir del efecto diferencial de los antagonistas de calcio, amlodipina y diltiazem, sobre la migración y la tubulogénesis endotelial inducidas por Epo, el siguiente objetivo fue explorar otros factores que pudieran contribuir a la actividad de ambos compuestos en este tipo celular.

Debido a su estructura molecular, que les confiere la capacidad de interactuar con membranas biológicas, amlodipina y diltiazem han sido descritos como *quenchers* de radicales libres con diferente efectividad (Mason et al., 1999). Dado que las especies reactivas de oxígeno tendrían un rol como activadores de la migración celular, se estudió el efecto de estos bloqueantes de canales de calcio en la acumulación de ROS en células EA.hy926.

Con este fin, se generó un estado prooxidante por incubación con la citoquina proinflamatoria $\text{TNF-}\alpha$ (100 ng/mL, 15 h), el cual, en ensayos previos, resultó comparable con el observado en presencia de peróxido de hidrógeno 100 μ M. En experimentos de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia con la sonda DCFH-DA en células EA.hy926, amlodipina fue capaz de reducir significativamente la carga de ROS generada por la citoquina proinflamatoria (**Figura 40**), mientras que diltiazem contribuyó al incremento citosólico de ROS estimulado por $\text{TNF-}\alpha$, y administrado separadamente provocó un leve aumento en los niveles de estas entidades químicas.

De acuerdo con estos hallazgos, la amlodipina no sólo bloquea el influjo de Ca^{2+} en células endoteliales, sino que también previene la formación de ROS; dos efectos que conjuntamente podrían inhibir la migración inducida por Epo. Por el contrario, pese a ser un antagonista de Ca^{2+} , el diltiazem ejerce una acción opuesta sobre la generación de ROS, que podría explicar al menos en parte su imposibilidad de impedir la migración endotelial. Estos resultados sugieren que la migración inducida por citoquinas requiere de una compleja interacción entre diferentes factores, como el calcio y las ROS.

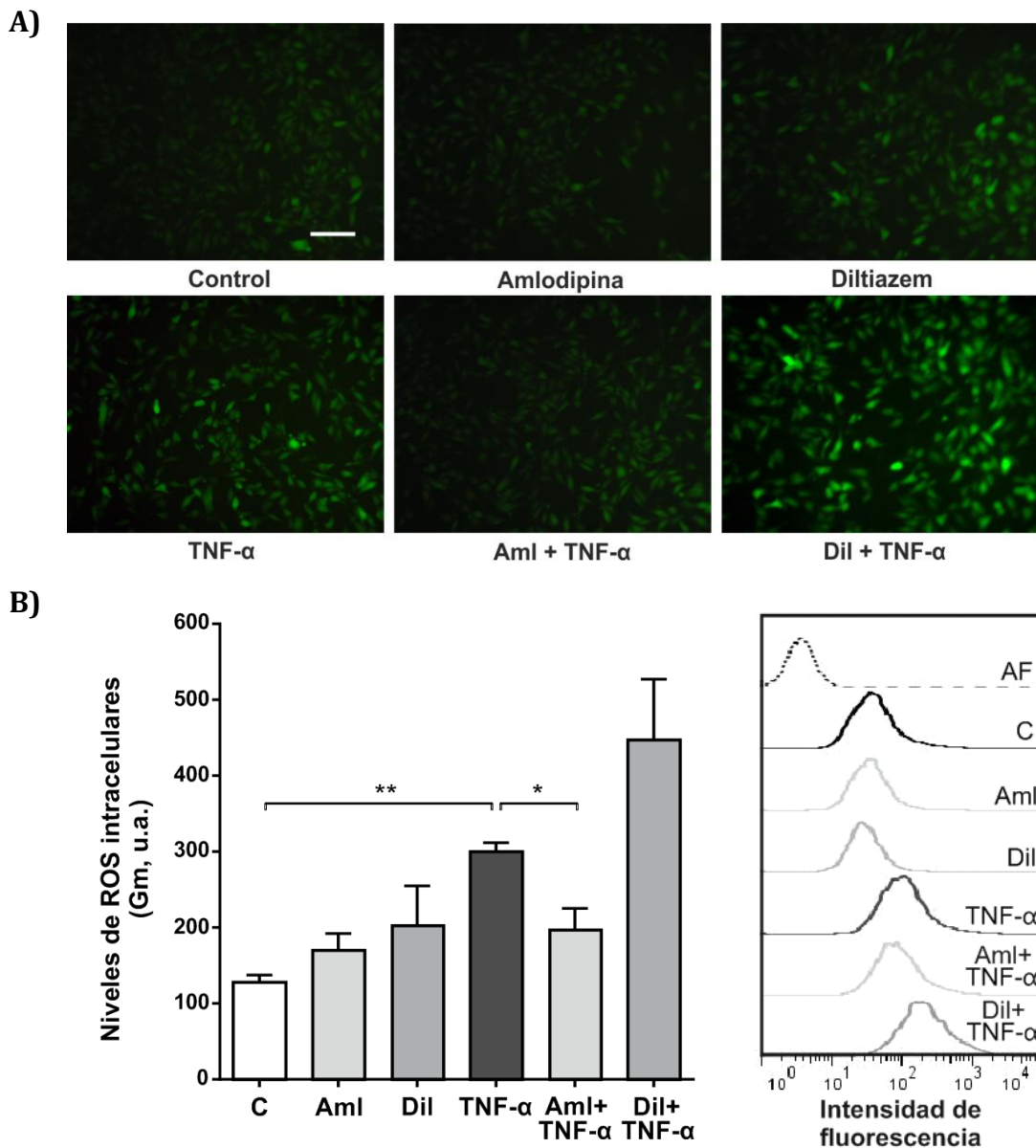


Figura 40. Efectos de amlodipina y diltiazem sobre la generación de ROS. Células EA.hy916 fueron preincubadas con amlodipina (1 μM) o diltiazem (5 μM) por 15 min previo al tratamiento con la citoquina proinflamatoria TNF- α (100 ng/mL) por 15 h. Al cabo del mismo, las células fueron marcadas con la sonda fluorescente DCFH-DA (3 μM , 30 min). **A)** Microscopía de fluorescencia. Las imágenes son representativas de los tratamientos analizados. La barra blanca representa 200 μm . **B)** Análisis por citometría de flujo. Las barras muestran media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (Geometric mean, Gm). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 7$. Los histogramas corresponden a un experimento representativo de citometría de flujo.

IV.4 Migración endotelial inducida por Epo en un ambiente proinflamatorio

Las células endoteliales pasan la mayor parte del tiempo en un estado de quiescencia, en el cual raramente se dividen o mueren, si bien se encuentran metabólicamente activas. Cuando ocurre una injuria (a causa de hipoxia, inflamación o *shear stress*), el endotelio se activa y las células quiescentes comienzan a exhibir un fenotipo protrombótico, proinflamatorio y proangiogénico. La proliferación y migración de células endoteliales son resultados de la inflamación a nivel vascular. En este sentido, un ambiente proinflamatorio puede sensibilizar a las células endoteliales a los efectos de factores proangiogénicos.

En virtud de lo anterior, los siguientes experimentos fueron realizados con el fin de determinar si la citoquina proinflamatoria TNF- α y Epo podrían actuar sinérgicamente promoviendo la migración de células endoteliales, y si el efecto antiangiogénico de la amlodipina se mantiene en estas condiciones.

IV.4.1 Inducción de la migración de células endoteliales por TNF- α

La citoquina proinflamatoria TNF- α fue capaz de inducir la migración de células EA.hy926 en ensayos de *wound healing* realizados empleando un rango de concentraciones entre 30 y 200 ng/mL, con un efecto máximo a los 100 ng/mL (**Figura 41**). Es interesante resaltar que, a diferencia de lo observado con Epo, el efecto promigratorio del TNF- α no parece depender fuertemente del calcio, como lo muestra la preincubación con el quelante EGTA.

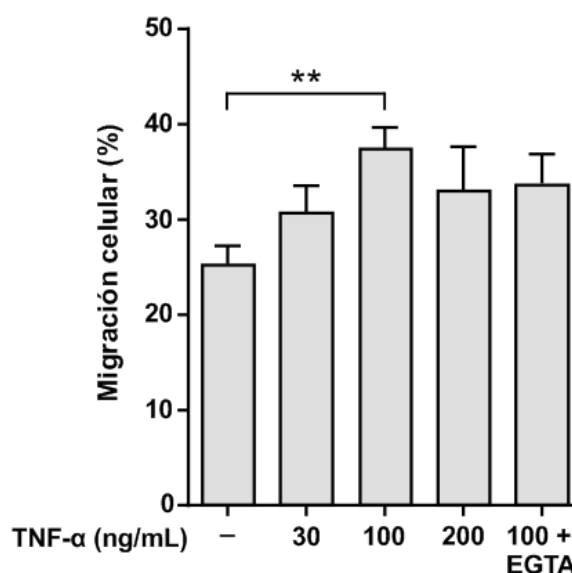


Figura 41. Efecto promigratorio de TNF- α en células endoteliales. Ensayo de *wound healing* en células EA.hy926 preincubadas con EGTA (1 mM, 10 min) y luego tratadas con TNF- α (30-200 ng/mL) durante 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. **P<0,01, Kruskal Wallis-Dunn, n=7.

IV.4.2 Efecto conjunto de TNF- α y Epo sobre la migración endotelial

A partir del efecto observado en presencia de TNF- α , se estudió la migración endotelial en respuesta a Epo en un ambiente proinflamatorio generado por esa citoquina. Para ello, se trataron células EA.hy926 con Epo y dos concentraciones de TNF- α : 30 ng/mL, a la cual el efecto promigratorio observado es leve (**Figura 42**), y 100 ng/mL, que representa el efecto máximo (**Figura 43**).

Los cultivos tratados con Epo y TNF- α 30 ng/mL mostraron un grado de migración significativamente mayor al alcanzado con cualquiera de las citoquinas aplicadas separadamente (**Figura 42**).

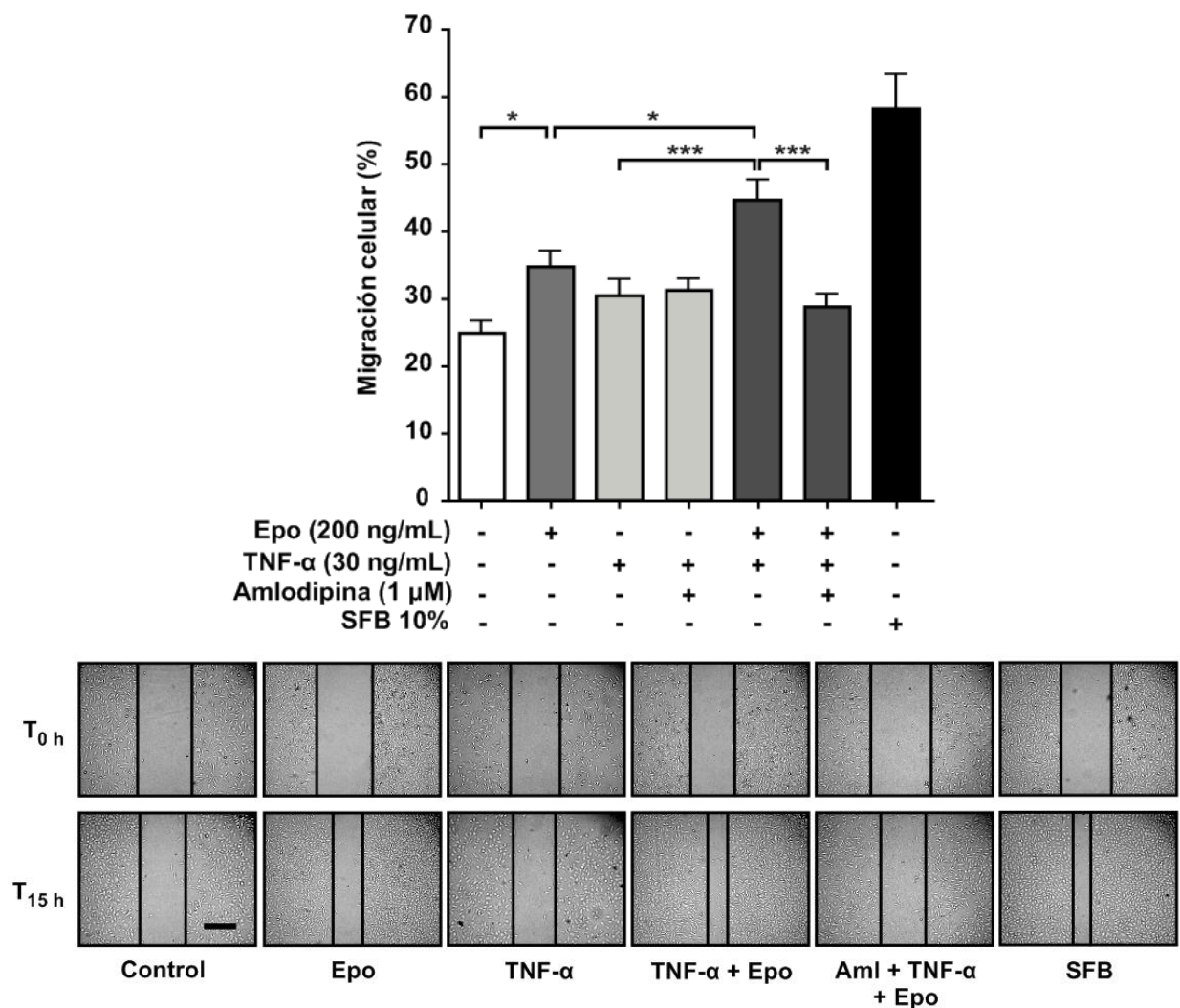


Figura 42. Efecto sinérgico de Epo y TNF- α 30 ng/mL sobre la migración endotelial. Ensayo de *wound healing* con células tratadas con Epo 200 ng/mL y TNF- α 30 ng/mL, durante 15 h. La preincubación con amlodipina (1 μ M) se realizó durante 10 min. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. *P<0,05 y ***P<0,001, Kruskal Wallis-Dunn, n=8. Las imágenes son representativas de los tratamientos ensayados. La línea negra representa 500 μ m.

El tratamiento previo con amlodipina anuló dicho efecto sinérgico, llevando la actividad migratoria de las células a niveles semejantes a los del Control. Dado que TNF- α no depende de calcio para promover la migración endotelial, el efecto inhibitorio de este antagonista de canales de Ca^{2+} debe estar relacionado con el mecanismo de acción de la Epo.

El efecto sinérgico entre Epo y TNF- α sobre la migración celular no se observó en presencia de 100 ng/mL de TNF- α , lo que podría indicar una desensibilización de la señalización (**Figura 43**).

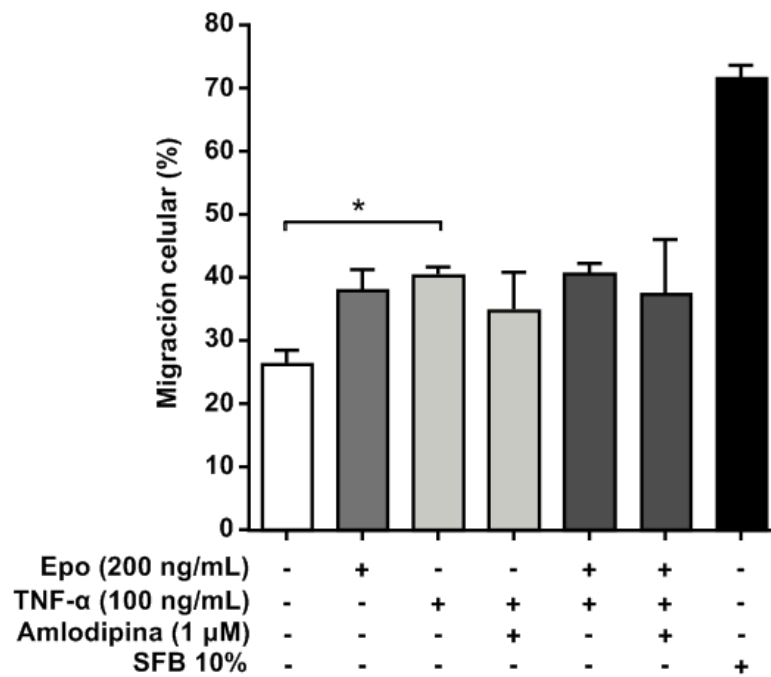


Figura 43. Efecto de Epo y TNF- α 100 ng/mL sobre la migración endotelial. Ensayo de wound healing con células tratadas con Epo 200 ng/mL y TNF- α 100 ng/mL, durante 15 h. La preincubación con amlodipina (1 μ M) se realizó durante 10 min. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%. Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de migración celular. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=5$.

Por otro lado, el tratamiento con la citoquina proinflamatoria mostró una tendencia a incrementar la migración endotelial en presencia de cEpo, sin alcanzar diferencias significativas. De forma similar a lo observado con Epo, este efecto fue más pronunciado con TNF- α 30 ng/mL (**Figura 44**).

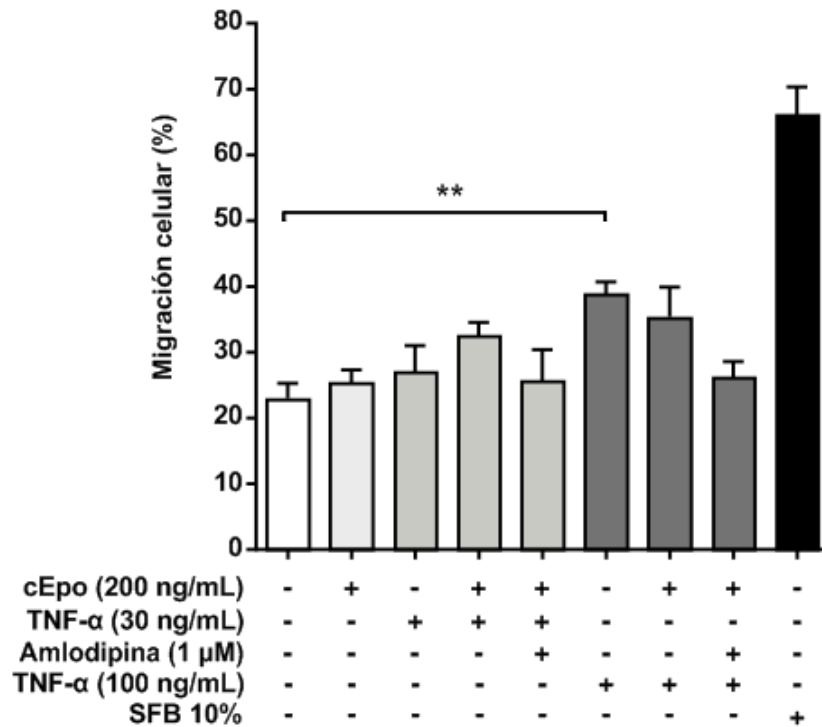


Figura 44. Efecto de cEpo y TNF-α sobre la migración endotelial. Ensayo de *wound healing* con células tratadas con cEpo 200 ng/mL y TNF-α 30 ó 100 ng/mL, durante 15 h. La preincubación con amlodipina (1 μM) se realizó durante 10 min. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%. Las barras representan media ± SEM del porcentaje de migración celular. **P<0,01, Kruskal Wallis-Dunn, n=5.

IV.4.3 Efecto de TNF-α y Epo sobre la expresión de receptores

Un trabajo de Wang et al. (2011) mostró un efecto sensibilizador del TNF-α sobre la formación de túbulos inducida por Epo, mediada por la inducción de EpoR. Con el fin de encontrar una explicación al efecto sensibilizador de TNF-α frente al tratamiento de células endoteliales con Epo, se estudiaron los niveles de expresión del receptor EpoR mediante citometría de flujo.

A un tiempo de incubación de 15 h, TNF-α y Epo separadamente incrementaron los niveles proteicos de EpoR, mientras que la coincubación de ambas citoquinas provocó el descenso de la expresión de EpoR a niveles basales, sugiriendo una activación más rápida y posiblemente una terminación más temprana de la señal por desensibilización (**Figura 45**).

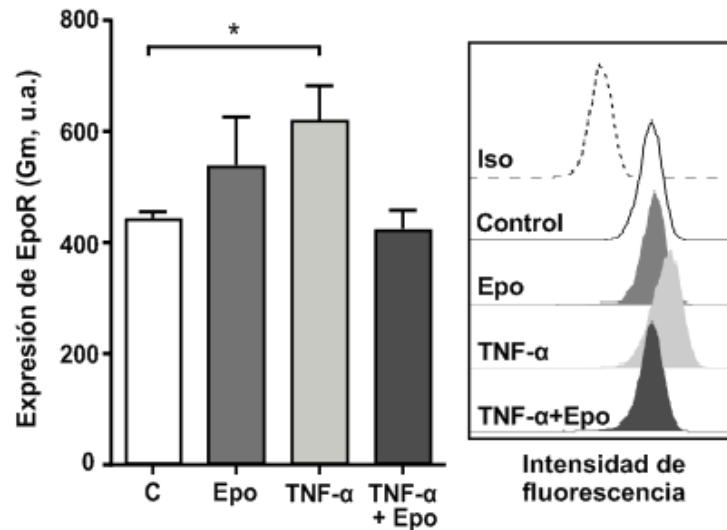


Figura 45. Niveles de expresión de EpoR. Células EA.hy926 fueron tratadas con Epo (200 ng/mL), TNF-α (30 ng/mL) o la combinación de ambos por 15 h, y posteriormente fijadas en paraformaldehído 0,5%. Los niveles de expresión de EpoR fueron analizados por citometría de flujo empleando un anticuerpo primario específico seguido del correspondiente anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488. Las barras representan media geométrica $\pm$ SEM de la intensidad de fluorescencia (*Geometric mean, Gm*). * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 3$. Se incluyen gráficos representativos de citometría de flujo para cada uno de los tratamientos.

Para poner a prueba este posible mecanismo, los niveles de EpoR fueron analizados por RT-PCR a un tiempo corto de incubación de 3 h, tras el cual se observó un incremento significativo del ARNm de EpoR en el tratamiento simultáneo con ambas citoquinas (**Figura 46**). Este resultado apoya la hipótesis de una activación rápida de la expresión de EpoR, seguida de un decaimiento más rápido con respecto al resto de los tratamientos.

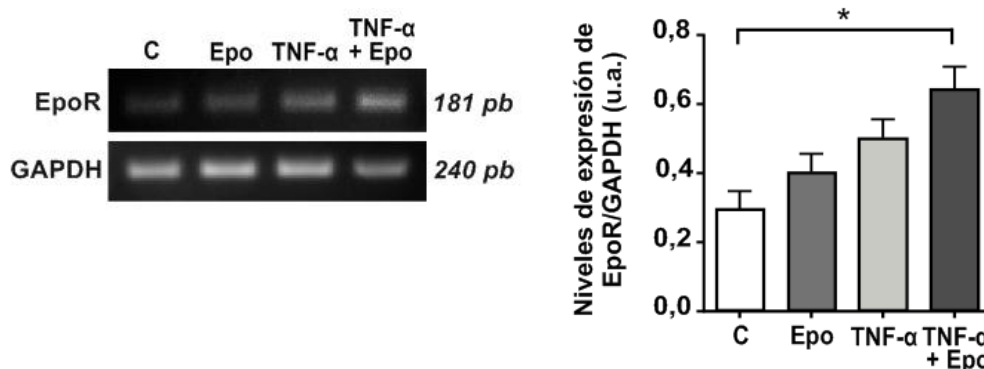


Figura 46. Niveles de expresión de ARNm de EpoR a tiempo corto de incubación. Células EA.hy926 fueron tratadas durante 3 h con Epo (200 ng/mL), TNF-α (30 ng/mL) o la combinación de ambos. Las muestras fueron analizadas por RT-PCR, y los niveles de ARNm de EpoR fueron estimados por densitometría de bandas. Las barras muestran media $\pm$ SEM de la densidad de banda correspondiente a TNF-α en forma relativa a GAPDH. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 3$.

Por otro lado, la aplicación simultánea de TNF- α (30 ng/mL) y Epo indujo significativamente los niveles de ARNm de TNFR1 a 15 h de tratamiento (coincidentes con la duración del ensayo de *wound healing*), sin cambios notorios cuando fueron administrados por separado (**Figura 47**).

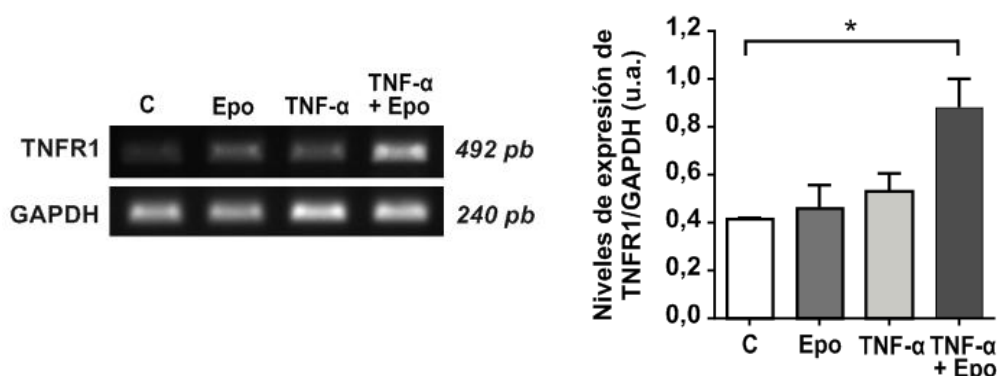
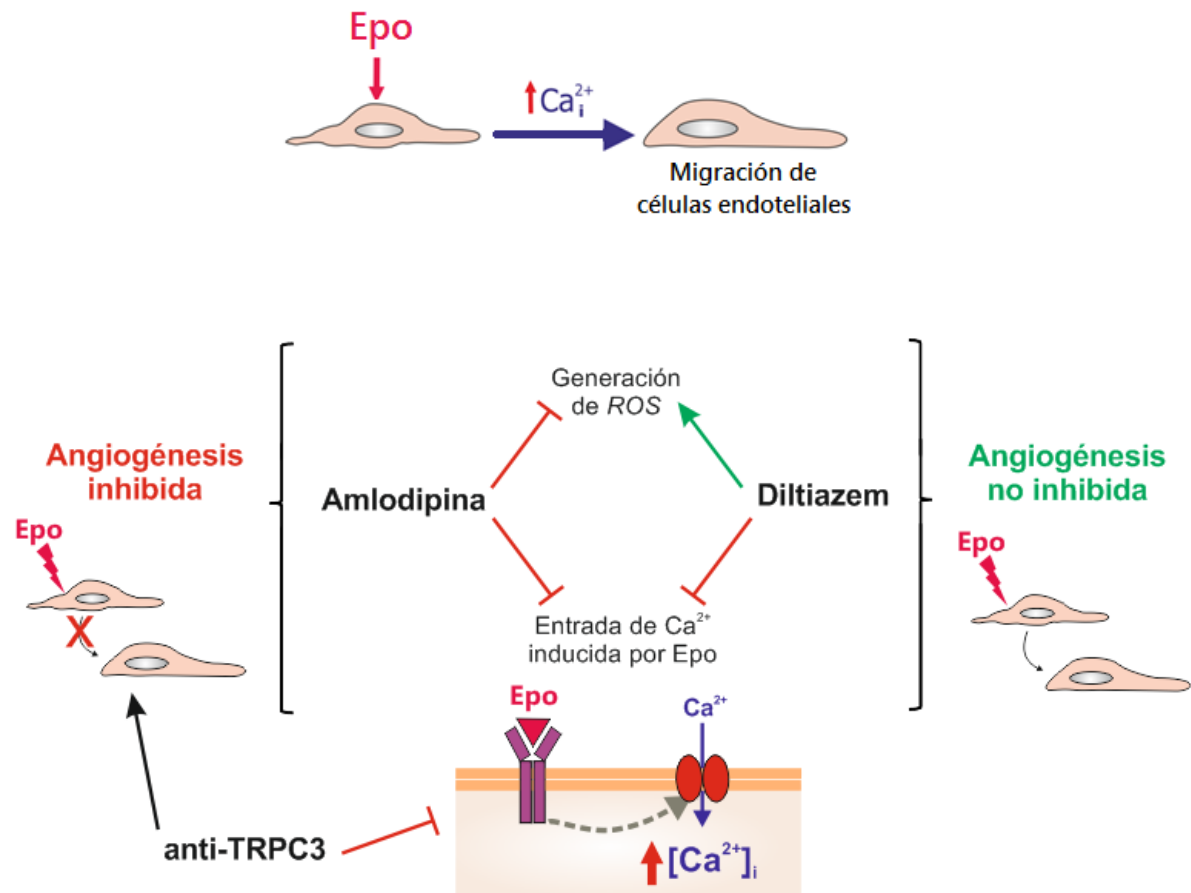


Figura 47. Niveles de expresión de ARNm de TNFR1. Células EA.hy926 fueron tratadas durante 15 h con Epo (200 ng/mL), TNF- α (30 ng/mL) o la combinación de ambos. Las muestras fueron analizadas por RT-PCR, y los niveles de TNFR1 fueron cuantificados por densitometría de bandas. Las barras muestran media $\pm$ SEM de la densidad de banda correspondiente a TNF- α en forma relativa a GAPDH. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 3$.

IV.5 Conclusiones

A partir de los resultados expuestos, se puede concluir que:

- El efecto promigratorio de Epo requiere de la entrada de calcio desde el medio extracelular, con la participación de canales de Ca^{2+} transientes (TRPC3) y operados por voltaje.
- El bloqueo de canales voltaje-dependientes por amlodipina y de canales TRPC3 mediante un anticuerpo específico inhibió el efecto promigratorio de Epo, sugiriendo su participación en el efecto proangiogénico de esta citoquina. Sin embargo, el diltiazem, otro inhibidor de canales de calcio, no anuló la actividad de Epo en este tipo celular.
- Las acciones contrarias de amlodipina y diltiazem sobre la generación de ROS podrían explicar su capacidad diferencial de afectar la migración celular.
- La presencia de un ambiente inflamatorio generado por TNF- α estimula aún más el efecto promigratorio de Epo en células endoteliales, a través de una mayor expresión de los receptores EpoR y TNFR1.
- La amlodipina es capaz de ejercer su efecto inhibitorio sobre la migración inducida por Epo en el ambiente proinflamatorio, con posibles implicancias en su uso terapéutico.



Discusión Capítulo IV

Los resultados presentados en este Capítulo resaltan la importancia del calcio en la migración de células endoteliales, y proporcionan evidencia en favor de la inhibición de la entrada de este catión en el tratamiento de patologías relacionadas con la angiogénesis.

Como lo sugieren los experimentos con los quelantes de Ca^{2+} , EDTA y EGTA (Fig. 27), y con el inhibidor de calpaína (Fig. 28), el ión Ca^{2+} sería un mediador intracelular de los efectos de Epo en la migración endotelial. Factores hematopoyéticos como Epo y GM-CSF han sido reconocidos como inductores de aumentos transientes de Ca^{2+} intracelular en precursores eritroides tempranos humanos, efecto atribuido a la liberación del catión desde depósitos intracelulares (Miller et al., 1988). Por otro lado, Vogel et al. (1997) reportaron un incremento pronunciado del calcio intracelular durante el primer minuto de estimulación con Epo en células endoteliales aórticas, inhibible por ausencia de Ca^{2+} en el medio. De acuerdo con este trabajo, en células EA.hy926 se observó un aumento transitorio de calcio durante los primeros 20 s del tratamiento con Epo. Tal incremento no se produjo en ausencia de Ca^{2+} en el medio de resuspensión (Fig. 29), sugiriendo el ingreso a la célula desde el medio extracelular. El derivado carbamilo de Epo, sin efecto sobre la migración de células endoteliales, no estimuló un aumento significativo de los niveles de calcio, reforzando la relación entre el Ca^{2+} y la motilidad celular.

Si bien no puede descartarse la posibilidad de que la Epo estimule la salida de calcio desde depósitos intracelulares, en base a los resultados obtenidos es claro que la inducción de los niveles de Ca^{2+} intracelular por Epo requiere la participación de canales de membrana. En este sentido, las células endoteliales presentan una amplia variedad de canales iónicos, de los cuales los canales de calcio representan una importante fracción. Sin embargo, la caracterización de sus patrones de expresión y su relevancia fisiológica ha sido difícil, dado que la posibilidad de detectarlos depende de los métodos de aislamiento y las condiciones de cultivo (Nilius y Droogmans, 2001).

Dado que las células endoteliales no son excitables, a diferencia de las de músculo liso vascular, la existencia de canales de calcio capaces de responder a pequeños cambios en el potencial de membrana es controvertida. Experimentos de electrofisiología llevados a cabo en células endoteliales de aorta bovina (Bossu et al., 1992) y de capilares de glándula adrenal bovina (Vinet y Vargas, 1999) demostraron la entrada de calcio por un mecanismo sensible a la dihidropiridina y dependiente de la hiperpolarización celular. Los resultados de la dinámica del calcio intracelular del presente estudio proporcionan información interesante acerca de la existencia de canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs) en células endoteliales. En forma

coincidente con Yakubu et al. (2002), que utilizó nifedipina para inhibir la afluencia de calcio mediada por bradiquinina en células endoteliales microvasculares de cerebro de cerdo, amlodipina y diltiazem fueron capaces de bloquear aumentos transitorios en calcio citosólico inducido por Epo en células EA.hy926 (Fig. 30).

Por otro lado, la existencia de canales de tipo transiente es reconocida desde hace tiempo en células endoteliales. TRPC3 es un canal de Ca^{2+} regulado por eritropoyetina durante la diferenciación de células eritroides (Tong et al., 2008), motivo por el cual fue interesante estudiar su participación en el influjo de Ca^{2+} debido a Epo en células EA.hy926. Mediante un anticuerpo específico contra TRPC3 no sólo se inhibió el incremento transitorio de Ca^{2+} estimulado por Epo y la migración de células EA.hy926 inducida por la citoquina, sino que también se detectó un aumento en los niveles de expresión de este canal tras 15 h de tratamiento con Epo (Figs. 30, 31 y 32). En forma consistente con su ausencia de efecto promigratorio, cEpo no modificó la expresión de TRPC3. Los niveles de expresión del canal TRPC6, implicado en la angiogénesis inducida por VEGF (Ge et al., 2009) y en el influjo de Ca^{2+} inducido por Epo en células CHO-S (Chu et al., 2004), no se vieron afectados por Epo en el modelo celular empleado.

La relación entre los canales de Ca^{2+} y K^{+} es estrecha en los vasos sanguíneos, ya que representa un importante mecanismo de regulación del tono vascular. En células de músculo liso vascular, la apertura de canales de K^{+} de alta conductancia activados por Ca^{2+} (BK) lleva al eflujo de K^{+} y a la hiperpolarización de la membrana, con el consecuente cierre de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, la disminución de la entrada de Ca^{2+} y vasodilatación. En el endotelio, sin embargo, la activación de canales de K^{+} de conductancia baja (SK) o intermedia (IK) activados por Ca^{2+} lleva a la entrada de Ca^{2+} , contribuyendo a la vasorelajación mediante un mecanismo dependiente de NO (Ledoux et al., 2006). Los resultados de esta Tesis muestran un efecto inhibitorio de la quinina en los influjos transientes de Ca^{2+} y en la migración de células endoteliales inducidos por Epo (Figs. 33 y 34), apoyando la participación de canales de Ca^{2+} y K^{+} en el efecto de esta citoquina.

De acuerdo con su estructura química, los antagonistas de calcio pueden clasificarse en fenilalquilaminas, benzodiazepinas y dihidropiridinas. Verapamil y diltiazem, que pertenecen a las dos primeras clases, respectivamente, son compuestos antihipertensivos con marcados efectos en la conducción cardíaca, por lo cual son empleados en el tratamiento de arritmias supraventriculares. Las dihidropiridinas son vasodilatadores más potentes con efectos mínimos sobre la contractilidad cardíaca. Desde la primera generación de dihidropiridinas lanzada en los años '60, como la nifedipina, se ha avanzado en la síntesis de compuestos farmacocinéticamente más estables y menos cardiosselectivos. Entre ellos, la amlodipina es una droga de elección para el tratamiento de la hipertensión (Fares et al., 2016).

La relación entre los antagonistas de calcio y la angiogénesis aún no es clara. Diferentes compuestos de la familia de las dihidropiridinas fueron estudiadas por sus efectos sobre la angiogénesis. Se ha reportado la promoción de la tubulogénesis por nifedipina en forma indirecta, mediante la producción de VEGF por parte de células de músculo liso vascular (Miura et al., 2005). La amlodipina también promovió indirectamente la formación de estructuras tubulares en un modelo de cardiomiopatía en hámster, mejorando la microcirculación coronaria (Kumamoto et al., 1999). En otro estudio, Nishizawa et al. (2010) observaron en ratas hipertensas un efecto proangiogénico de la nifedipina, que no fue igualado por nitrendipina. Diltiazem, por otra parte, impidió la neovascularización en un modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno (Higgins et al., 1999), mientras que otros autores reportaron un efecto positivo de este compuesto sobre la expresión de metaloproteasa-1 y la actividad colagenolítica en células de músculo liso vascular tratadas con el factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (Wada et al., 2001).

Los ensayos de migración y tubulogénesis *in vitro* realizados en el presente estudio revelaron un efecto diferencial de amlodipina y diltiazem sobre la angiogénesis: mientras que la capacidad proangiogénica de Epo y VEGF fue inhibida por amlodipina, diltiazem no afectó estos procesos (Figs. 35 a 38). Estas diferencias podrían relacionarse con la habilidad de ambos compuestos de activar caminos de señalización. Yue et al. (2004) han reportado un incremento de la expresión de metaloproteasa-2 (MMP-2) en cardiomiocitos debida a nifedipina, probablemente mediante la producción de NO, mientras que amlodipina, una dihidropiridina de tercera generación que no tiene efecto sobre la producción de NO, disminuyó los niveles de MMP-2.

La participación de ROS en la migración de células endoteliales —tal como fue observado en ensayos de inhibición con *N*-acetilcisteína y ácido ascórbico (Figs. 23 y 24)—, sugiere que la relación entre los antagonistas del calcio y la generación de ROS puede ser responsable de las diferencias observadas en cuanto al efecto de amlodipina y diltiazem en la migración celular. Las dihidropiridinas como la amlodipina son reconocidas por sus efectos antioxidantes en la vasculatura (Toma et al., 2011), con mayor efectividad que el verapamil y el diltiazem tanto en experimentos *in vitro* (Mason et al., 1999) como en cultivos celulares (Mak et al., 1992). Estos resultados pueden explicarse por diferencias estructurales que les confieren una capacidad diferencial de interactuar con membranas biológicas. Si bien ambos compuestos presentan anillos aromáticos en su estructura lo que les permite la estabilización de radicales libres por resonancia, la amlodipina presenta un hidrógeno adicional en el anillo DHP, que facilita un mecanismo de *quenching* de radicales libres. En el presente estudio, amlodipina redujo la carga intracelular de ROS generada por una exposición de 15 h a TNF- α , mientras que diltiazem incrementó la generación de estas entidades químicas (Fig. 40), sugiriendo una relación compleja entre las ROS y el Ca²⁺ en la migración de células endoteliales.

Dado que las células endoteliales activadas exhiben un fenotipo proangiogénico, la citoquina proinflamatoria TNF- α es capaz de inducir la migración endotelial y la angiogénesis, como ha sido reportado por diferentes autores (Gao et al., 2002; Shu et al., 2012) y confirmado en nuestros experimentos (Fig. 41). En esta Tesis, el tratamiento con baja concentración de TNF- α estimuló significativamente la actividad promigratoria de Epo en ensayos de *wound healing* realizados con cultivos de EA.hy926 (Fig. 42). En un trabajo anterior, la sensibilización con TNF- α incrementó el efecto proangiogénico de Epo en células endoteliales de la microvasculatura cerebral, en comparación con cultivos tratados solamente con Epo (Wang et al., 2011). Este efecto del TNF- α fue atribuido por los autores a una inducción de EpoR mediado por el receptor TNFR1, lo cual fue reportado también en un modelo de neuronas corticales primarias deprivadas de glucosa, donde el aumento de expresión de EpoR y VEGF por TNF- α confería neuroprotección (Taoufik et al., 2008).

En concordancia con estos autores, hemos detectado un incremento significativo en los niveles de ARNm de TNFR1 a 15 h de tratamiento simultáneo con TNF- α y Epo (Fig. 47). Sin embargo, los niveles de proteína de EpoR, elevados por incubación con cada citoquina por separado, no se vieron aumentados por el tratamiento simultáneo (Fig. 45). Para probar la hipótesis de una activación más rápida seguida de desensibilización, se midieron los niveles de ARNm de EpoR a un tiempo de incubación de 3 h, observando un aumento en la expresión por incubación simultánea con ambas citoquinas, resultado que confirma la presunción inicial (Fig. 46). Estos resultados muestran que el aumento del efecto promigratorio de Epo en células endoteliales en un ambiente proinflamatorio es mediado por una mayor expresión de los receptores EpoR y TNFR1.

El efecto antiangiogénico de la amlodipina puede tener importantes implicancias en el tratamiento del corazón isquémico, una condición patológica que puede verse beneficiada por la proliferación de vasos sanguíneos. La isquemia se caracteriza por la liberación de TNF- α , la acumulación de ROS y la generación de un ambiente proinflamatorio que podría estimular el efecto proangiogénico de la Epo, siendo éste un proceso favorable al paciente. Sin embargo, la coadministración de amlodipina, una droga de elección en el tratamiento de daño isquémico por su acción sobre la presión arterial, podría contrarrestar los efectos beneficiosos de la estimulación terapéutica de la angiogénesis, mediada por Epo.

CAPÍTULO V

Participación de acuaporina-1 en la migración de células endoteliales inducida por eritropoyetina

Las acuaporinas, una familia de proteínas transmembrana que permiten el pasaje de agua y pequeños solutos a través de la bicapa lipídica, han sido descritas como esenciales en la migración de diversos tipos celulares. En células migratorias, se ha demostrado que AQP-1 participa en la formación de lamelipodios permitiendo el ingreso de agua a favor del gradiente osmótico generado por un aumento local de la concentración de iones, debido a la actividad de canales iónicos, y a la despolimerización del citoesqueleto de actina (Belge y Devuyst, 2006).

La expresión de acuaporina-1 (AQP-1) ha sido reportada tanto en el endotelio vascular normal como en la microvasculatura tumoral (Verkman, 2006), y su inhibición ha sido asociada previamente a un impedimento de la angiogénesis (Saadoun et al., 2005). A partir de estos antecedentes, los siguientes experimentos fueron realizados para dilucidar si existe una relación entre el comportamiento proangiogénico de eritropoyetina y la función de acuaporina-1 en la migración celular.

V.1 Expresión de AQP-1 en células endoteliales

Con el fin de corroborar la presencia de AQP-1 en células endoteliales, se emplearon diferentes técnicas para determinar su expresión a nivel de ARNm y de proteína. Mediante *primers* específicos se detectó por RT-PCR la presencia de ARNm de AQP-1 en células EA.hy926, comparativamente con una muestra obtenida de células de la línea eritroide UT-7 (**Figura 48**).

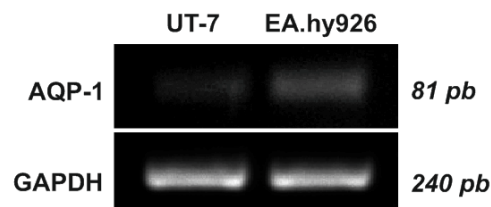


Figura 48. Detección de AQP-1 en células endoteliales. A partir de ADNc de células EA.hy926, y empleando *primers* específicos, se amplificó un fragmento del gen de AQP-1 mediante RT-PCR y se analizó por electroforesis en gel de agarosa. La línea eritroide UT-7 fue empleada a modo comparativo.

La expresión de AQP-1 a nivel de proteína también fue confirmada por marcación con un anticuerpo específico y citometría de flujo tanto en cultivos primarios de células HUVEC como en su línea celular derivada EA.hy926 (**Figura 49 A**). La expresión de AQP-1 en esta última línea celular fue confirmada mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 49 B**).

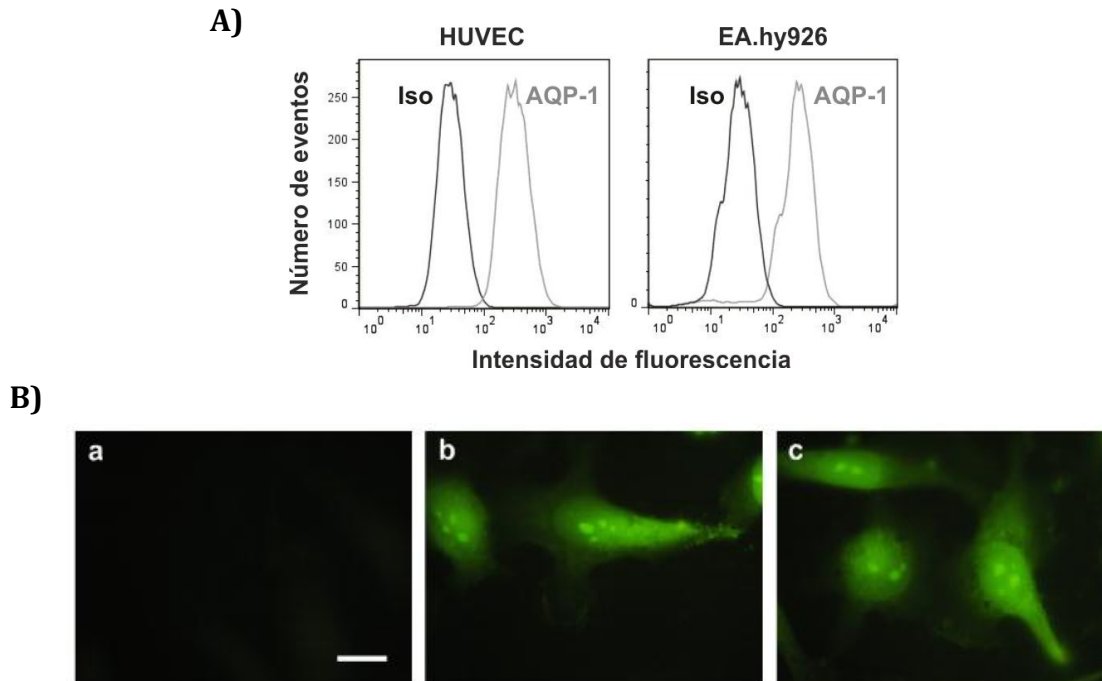


Figura 49. Detección de AQP-1 en células endoteliales. A) Determinación de AQP-1 por citometría de flujo. Células HUVEC, y EA.hy926 fueron marcadas con el anticuerpo primario anti-AQP-1 y luego con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488, para su posterior análisis por citometría de flujo. Los gráficos son representativos de 3 determinaciones independientes. **B)** Microscopía de fluorescencia de células EA.hy926. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con un anticuerpo primario específico contra AQP-1, y en forma posterior con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor-488. Se incluye un control negativo de fluorescencia (a), donde las células sólo fueron marcadas con el anticuerpo secundario conjugado, y dos fotografías representativas de células positivas para AQP-1 (b y c). La línea blanca corresponde a 20 μ m.

V.2 Participación de AQP-1 en la migración endotelial inducida por SFB y por Epo

Tras haber confirmado su expresión en células EA.hy926, el siguiente objetivo fue estudiar la participación de AQP-1 en la migración endotelial inducida por factores como SFB y Epo. Para ello, se realizaron ensayos de *wound healing* en presencia de un inhibidor inespecífico de acuaporinas, como el ión mercurio (Hg²⁺), o de un ARN interferente (siRNA) específico para este canal de agua.

V.2.1 Inhibición de acuaporinas por Hg^{2+}

Dado que no existen inhibidores farmacológicos disponibles para AQP-1, en primera instancia se empleó un metal divalente como el mercurio, que a pesar de su eficacia como inhibidor del pasaje de agua a través de acuaporinas, puede comprometer la viabilidad celular. Con el fin de utilizar el ión Hg^{2+} como inhibidor de acuaporinas descartando un posible efecto citotóxico, se realizaron ensayos de *wound healing* a tiempo corto (5 h) en presencia de SFB, un importante inductor de la motilidad celular.

Como se observa en la **Figura 50 A**, la migración de células EA.hy926 incubadas por 5 h en presencia de SFB fue inhibida por HgCl_2 en forma dependiente de la concentración, presentando un mínimo a 20 μM . Mediante ensayos de MTT, realizados en los mismos cultivos a los que se les había practicado la herida, se determinó que dicho efecto inhibitorio del HgCl_2 se relaciona con el mecanismo de migración y no con una disminución de la viabilidad celular por efecto tóxico (**Figura 50 B**).

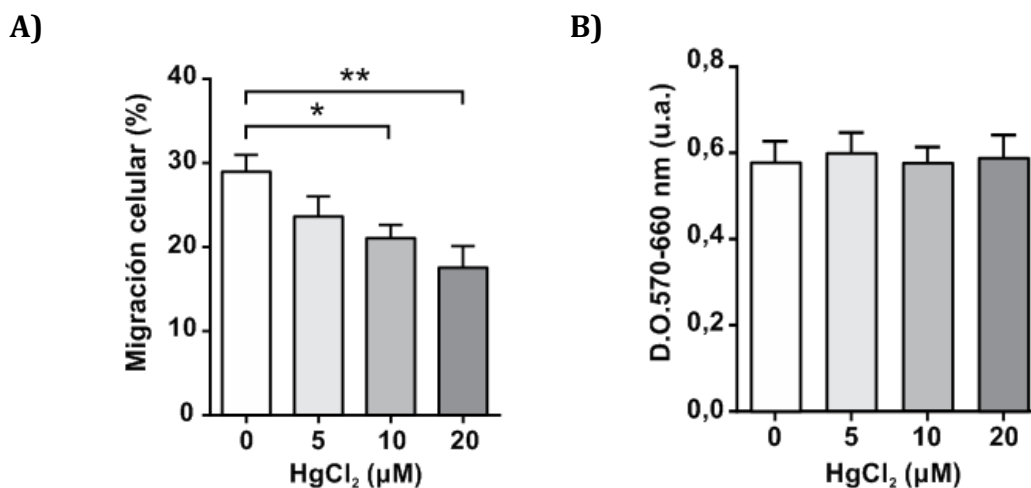


Figura 50. Inhibición por HgCl_2 de la migración endotelial inducida por SFB en células EA.hy926. **A)** Ensayo de *wound healing* con células EA.hy926 incubadas con SFB 10% y el inhibidor de acuaporinas HgCl_2 (5 – 20 μM) durante 5 h. Las barras representan media $\pm$ SEM de la migración celular relativa al tiempo inicial ($t = 0$). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=5$. **B)** Ensayo de MTT realizado sobre los cultivos en los que se midió *wound healing*. Las barras representan media $\pm$ SEM de la densidad óptica a 570 nm (con referencia a 660 nm). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Kruskal Wallis, $n=5$).

Un comportamiento similar fue observado en células HUVEC, donde el tratamiento con HgCl_2 mostró una tendencia a disminuir el efecto promigratorio del SFB 10%, sin afectar la viabilidad celular (**Figura 51**).

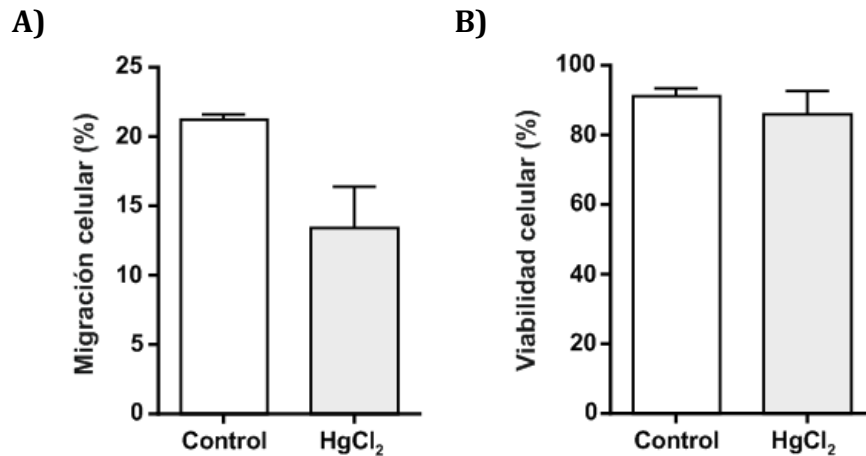


Figura 51. Inhibición por HgCl₂ de la migración endotelial inducida por SFB en células HUVEC. **A)** Ensayo de *wound healing* con células HUVEC incubadas con SFB 2% y el inhibidor de acuaporinas HgCl₂ (10 μ M) durante 6 h. Se emplearon como control cultivos incubados con SFB 2%. Las barras representan media $\pm$ SEM de la migración celular relativa al tiempo inicial ($t = 0$) ($n=2$). **B)** Las barras representan media $\pm$ SEM del porcentaje de células viables en cada grupo experimental, determinado a partir de la exclusión del colorante azul Tripán por células expuestas durante 6 h a los tratamientos mencionados en A ($n=2$).

Con el objeto de determinar si el mecanismo de migración inducida por Epo observado en células endoteliales (Figura 3) involucra la actividad de acuaporinas, experimentos de *wound healing* fueron realizados en presencia de HgCl₂ (10 μ M) durante 15 h, seguidos de ensayos de MTT para descartar un posible efecto citotóxico del Hg²⁺. La migración inducida por Epo fue inhibida significativamente por coincubación con HgCl₂ (**Figura 52 A y C**) sin que la viabilidad celular resultase afectada, tal como lo muestra el ensayo de MTT realizado sobre los mismos cultivos (**Figura 52 B**). Este resultado apoya la participación de acuaporinas en la actividad promigratoria de Epo.

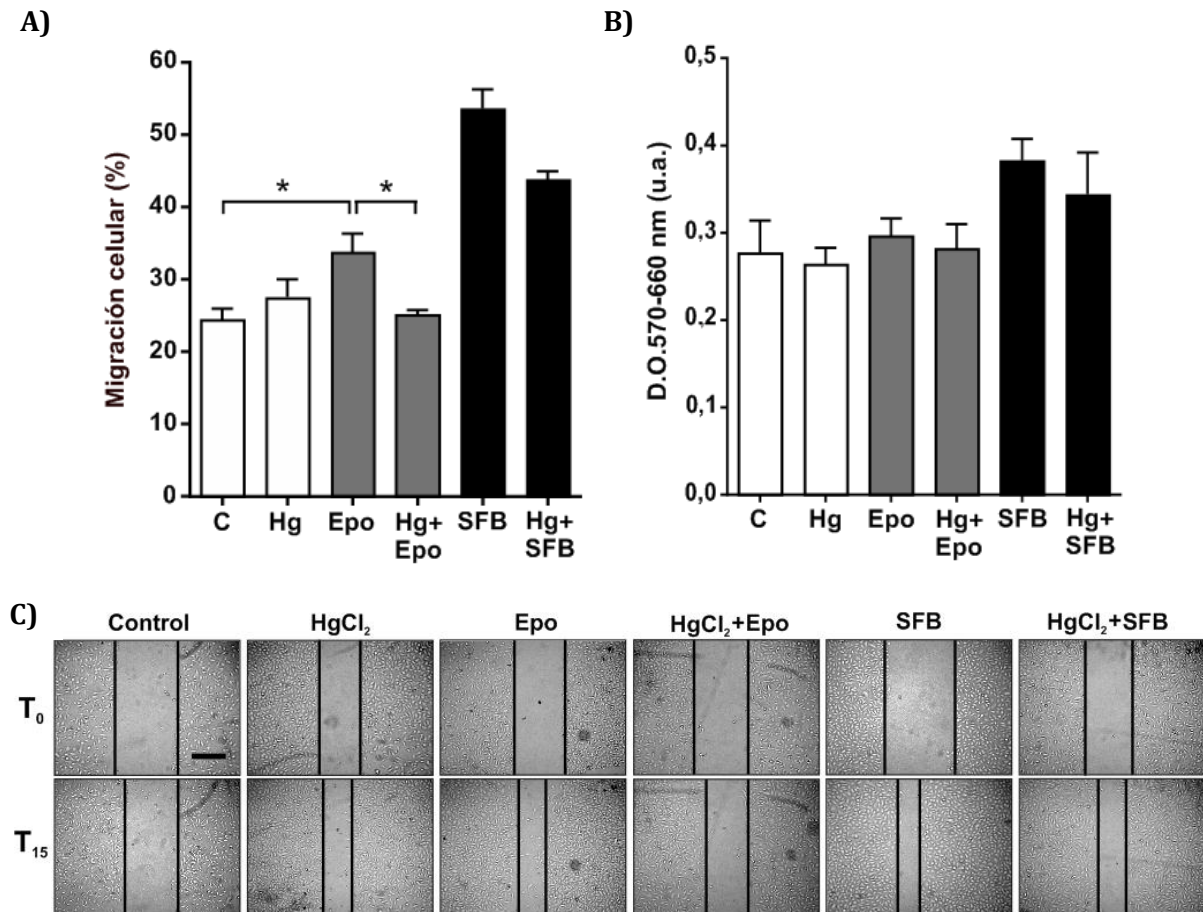


Figura 52. Inhibición por HgCl₂ de la migración endotelial inducida por Epo en células EA.hy926. **A)** Ensayo de *wound healing* con células EA.hy926 incubadas con Epo (200 ng/mL) y el inhibidor de acuaporinas HgCl₂ (10 μ M) durante 15 h. Las barras representan media $\pm$ SEM de la migración celular relativa al tiempo inicial (T = 0). *P<0,05, Kruskal Wallis-Dunn, n=6. Controles: cultivos sin SFB (C) y con SFB 10%. **B)** Ensayo de MTT realizado sobre los cultivos en los que se midió *wound healing*. Las barras representan media $\pm$ SEM de la densidad óptica da 570 nm (con referencia a 660 nm). No se observaron diferencias significativas entre Epo y Epo + HgCl₂ (Kruskal Wallis-Dunn, n=6). **C)** Fotografías representativas de los tratamientos empleados. La línea negra corresponde a 500 μ m.

V.2.2 Inhibición de AQP-1 por siRNA específico

Los ensayos de migración celular en presencia de un inhibidor inespecífico de acuaporinas como el ión Hg²⁺ permitieron relacionar la actividad de estos canales de agua con la acción de Epo sobre la motilidad de células endoteliales. Dado que la AQP-1 es la representante de la familia con mayor expresión en este tipo celular, la participación de este canal de agua en la migración inducida por Epo fue evaluada mediante inhibición específica con la técnica de interferencia por ARN (ARNi). En este caso, los fragmentos “molde” utilizados fueron siRNAs (*small interfering RNAs*) generados a partir de la secuencia del ARNm de la AQP-1 humana. Como control de transfección se empleó un siRNA comercial contra la proteína fluorescente verde GFP, no expresada en células EA.hy926.

En ensayos de *wound healing* realizados en presencia de Epo, las células transfectadas con siRNA de AQP-1 mostraron una capacidad migratoria significativamente menor a la observada en células no

transfectadas o transfectadas con siRNA de GFP (**Figura 53**). El siRNA de AQP-1 también disminuyó el cierre de la herida en células tratadas con SFB 10%. Si bien en este caso el siRNA de GFP redujo la migración estimulada con SFB, este efecto fue menos marcado que el observado por silenciamiento de AQP-1.

Los resultados muestran que AQP-1 desempeña una función importante en la migración de células endoteliales inducida por Epo.

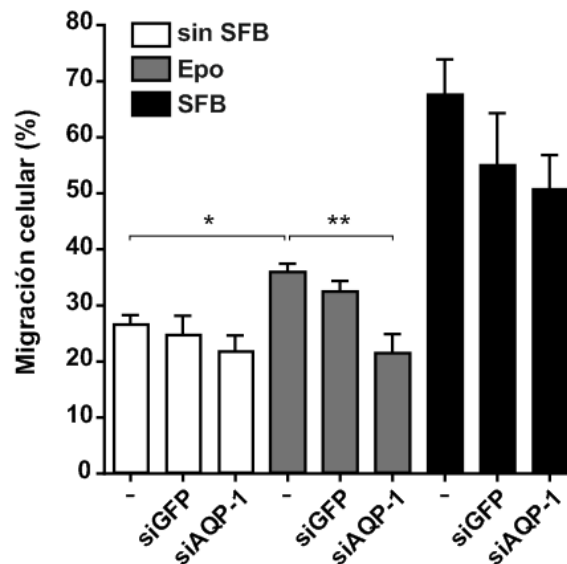


Figura 53. Inhibición de AQP-1 por siRNA en la migración de células endoteliales. Células EA.hy926 fueron transfectadas con siRNA de AQP-1 (siAQP-1, 100 pM) o igual concentración de siRNA de GFP (siGFP, control de silenciamiento), 24 h antes de inducir el arresto de los cultivos (8 h) y realizar el ensayo de *wound healing* (15 h) con el agregado de Epo (200 ng/mL) o SFB (10%). Las barras representan media $\pm$ SEM de la migración celular relativa al tiempo inicial ($t = 0$). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, Kruskal Wallis-Dunn, $n = 5$. Controles: cultivos sin SFB (C) o con SFB 10%.

V.3 Modulación de la expresión de AQP-1 por Epo

V.3.1 Inducción de AQP-1 por Epo

Los resultados obtenidos en los ensayos de migración en presencia del inhibidor $HgCl_2$ y del siRNA específico de AQP-1 ponen de manifiesto la participación de este canal de agua en el efecto promigratorio de Epo en células endoteliales. En base a esto, se postuló que Epo es capaz de modular la expresión de AQP-1 en células EA.hy926, por lo que se decidió estudiar esta hipótesis así como los mecanismos de acción involucrados.

Mediante *real time* RT-PCR se detectó un incremento significativo en la expresión de AQP-1 en células EA.hy926 tras 24 h de exposición a Epo, mientras que cEpo, su derivado no promigratorio, no tuvo efecto sobre los niveles de ARNm de AQP-1 (**Figura 54**).

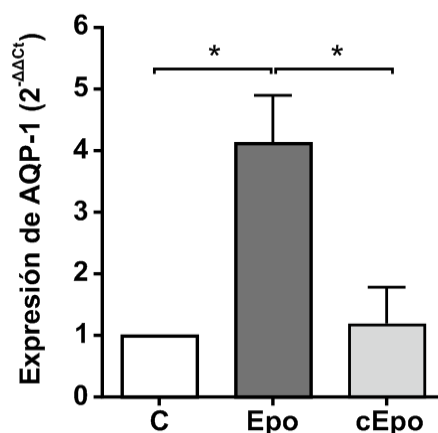


Figura 54. Niveles de ARNm de AQP-1 en presencia de Epo y cEpo. Real time RT-PCR de células EA.hy926 tratadas por 24 h con Epo o cEpo (200 ng/mL). Se empleó como control células incubadas en medio sin SFB. Las barras representan media $\pm$ SEM del nivel de expresión de AQP-1 relativo al control de GAPDH ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), expresado en unidades arbitrarias. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=5$.

Estos resultados fueron corroborados mediante el estudio de los niveles proteicos de AQP-1 por citometría de flujo con un anticuerpo específico contra AQP-1. Si bien a un tiempo de incubación de 24 h no se observaron cambios significativos en la expresión de este canal de agua, tras 48 h de exposición, Epo estimuló el aumento de los niveles de AQP-1 en células EA.hy926, mientras que igual concentración de cEpo no tuvo dicho efecto (**Figura 55 A**). Los resultados obtenidos en células EA.hy926 también fueron observados en células HUVEC (**Figura 55 B**).

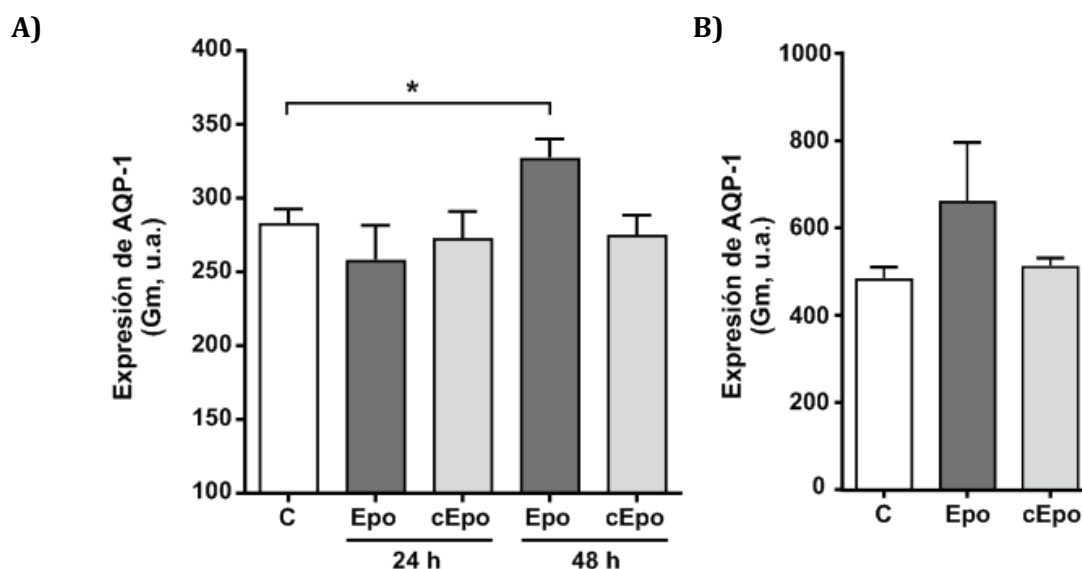


Figura 55. Expresión proteica de AQP-1 en presencia de Epo y cEpo. A) Citometría de flujo en células EA.hy926 tratadas por 24 o 48 h con Epo o cEpo (200 ng/mL). Se emplearon como control células incubadas en medio sin SFB. Las barras representan media $\pm$ SEM la media geométrica de fluorescencia (*Geometric mean*, Gm), expresada en unidades arbitrarias. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=7$. **B)** Citometría de flujo en células HUVEC tratadas durante 48 h con Epo o cEpo (200 ng/mL). Control: células incubadas en medio sin SFB. Las barras representan media $\pm$ SEM la media geométrica de fluorescencia (*Geometric mean*, Gm), expresada en unidades arbitrarias ($n=2$).

V.3.2 Participación de calcio en la inducción de AQP-1 por Epo

El hallazgo de un efecto inductor de Epo sobre la expresión de AQP-1 generó interrogantes acerca de los mecanismos involucrados. Dada la importancia del Ca^{2+} como mediador de la actividad proangiogénica de Epo, que fuera demostrada en el Capítulo IV, y la participación de este catión en la expresión y la dinámica de AQP-1 en membrana reportada por diferentes autores, se decidió estudiar la relación entre Epo, Ca^{2+} y AQP-1 a nivel de expresión génica en células endoteliales.

Experimentos realizados en presencia del quelante de Ca^{2+} EGTA mostraron inhibición del efecto estimulante de Epo sobre los niveles de ARNm de AQP-1 (**Figura 56**). La importancia de este catión en la regulación de los niveles de AQP-1 también puede apreciarse en el tratamiento con ionóforo de calcio, que produjo un aumento significativo en la cantidad de ARNm de AQP-1, comparable con el inducido por Epo.

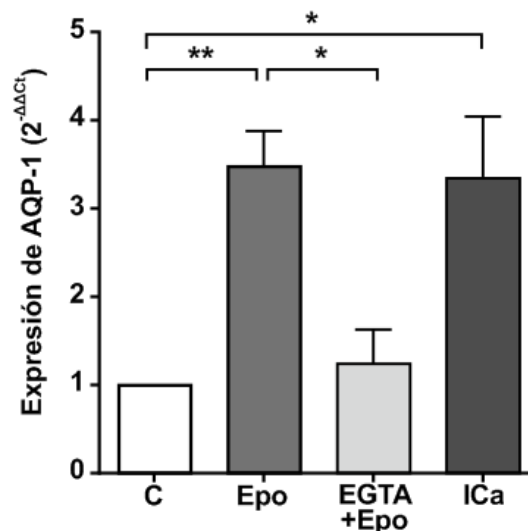


Figura 56. Participación del calcio en la inducción de AQP-1 por Epo. *Real time* RT-PCR de células EA.hy926 tratadas por 24 h con Epo (200 ng/mL) o ionóforo de calcio (ICa, 20 μM). La preincubación con EGTA (1 mM) se realizó por 10 min. Se emplearon como control células incubadas en medio sin SFB. Las barras representan media $\pm$ SEM del nivel de expresión de AQP-1 relativo a GAPDH, cuantificado mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, y expresado en unidades arbitrarias. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=5$.

V.3.3 Participación de NO en la inducción de AQP-1 por Epo

En el Capítulo III se determinó la participación necesaria de la NOS endotelial en el efecto promigratorio de Epo. A partir de este resultado, se realizaron experimentos para determinar si el óxido nítrico podría representar otro de los posibles mecanismos de la inducción de AQP-1 por Epo, además del calcio. Con este fin, los niveles de ARNm de AQP-1 fueron determinados en presencia del inhibidor de eNOS L-NMMA. Como se observa en la **Figura 57**, la inhibición de eNOS disminuyó significativamente el incremento en los niveles de AQP-1 por Epo, apoyando la participación de NO en este efecto.

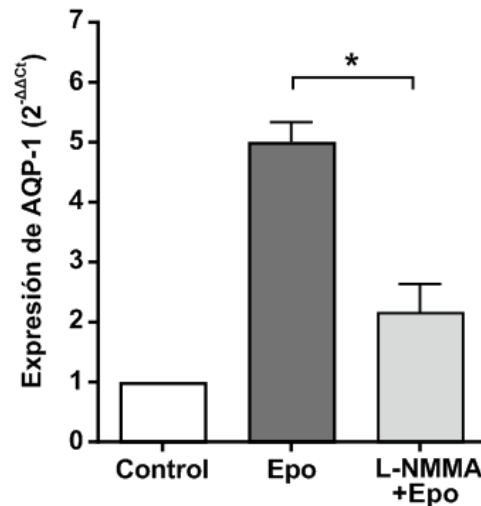
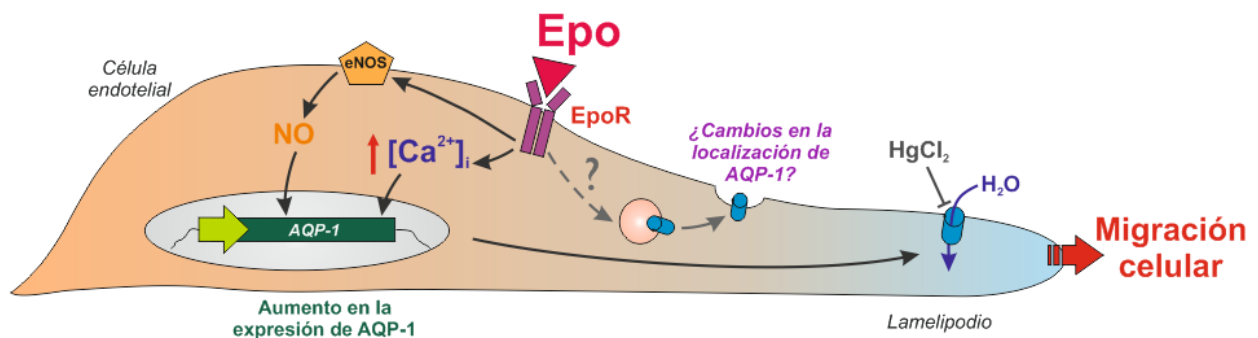


Figura 57. Participación de NO en la inducción de AQP-1 por Epo. Real time RT-PCR de células EA.hy926 tratadas por 24 h con Epo (200 ng/mL). La preincubación con L-NMMA (25 nM) se realizó por 10 min. Se emplearon como control células incubadas en medio sin SFB. Las barras representan media $\pm$ SEM del nivel de expresión de AQP-1 relativo a GAPDH, cuantificado mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, expresado en unidades arbitrarias. * $P < 0,05$, Kruskal Wallis-Dunn, $n=6$.

V.4 Conclusiones

A partir de los resultados presentados en este Capítulo podemos concluir que:

- Las células endoteliales HUVEC y EA.hy926 expresan AQP-1.
- La actividad de AQP-1 es requerida en el efecto promigratorio de SFB y de Epo, como se observó en ensayos de inhibición por Hg^{2+} y silenciamiento por siRNA, tanto en células EA.hy926 como en HUVEC.
- Epo induce la expresión de AQP-1 en forma dependiente de calcio y óxido nítrico. Por otro lado, el derivado no promigratorio, cEpo, no incrementó los niveles de expresión de este canal de agua, lo que refuerza su participación en el proceso de migración celular.



Discusión Capítulo V

Los resultados presentados en este Capítulo proponen a la acuaporina-1 (AQP-1) como un mediador del efecto promigratorio de Epo en células endoteliales.

Trabajos anteriores han demostrado el papel esencial que cumplen las acuaporinas en la motilidad celular, con particular interés en la angiogénesis tumoral y la metástasis. Saadoun et al. (2005) reportaron menor vascularización de tumores inducidos por implantación de células en ratones deficientes en AQP-1, dado que la ausencia de este canal de agua impide la migración, la adhesión y la formación de túbulos de células endoteliales. En concordancia con estos hallazgos experimentales, se ha observado sobreexpresión de AQP-1 en líneas celulares tumorales humanas de pulmón (Hoque et al., 2006), así como también en muestras de pacientes de cáncer de colon (Kang et al., 2014), cerebro (Saadoun et al., 2002) y cáncer de mama invasivo (Qin et al., 2016), en los cuales los niveles del canal de agua correlacionan con el grado de malignidad y son indicadores de peor pronóstico.

El modelo propuesto de participación de esta acuaporina en la migración endotelial involucra también la participación de canales iónicos y del citoesqueleto. Ante un estímulo promigratorio, el ingreso de sodio por activación de canales iónicos sumado a la despolimerización del citoesqueleto de actina, incrementan la presión osmótica en el frente de avance de la célula, con lo cual aumenta el flujo de agua mediado por AQP-1 a favor del gradiente osmótico. En este sentido, Hu y Verkman (2006) localizaron AQP-1 en lamelipodios de células tumorales migrantes, y se ha demostrado su asociación con la proteína de *scaffold* Lin7 y con β -catenina, relacionada con la remodelación del citoesqueleto de actina, en células microvasculares de la línea HMEC-1 (Monzani et al., 2009). El estiramiento localizado de la membrana en el lamelipodio activa canales de Ca^{2+} que permiten la ocurrencia de pulsos de calcio intracelulares y la consecuente activación de la maquinaria migratoria (Belge y Devuyt, 2006).

AQP-1 se encuentra altamente expresada en células endoteliales de diverso origen (Verkman, 2006), y en este Capítulo se demostró su expresión tanto en células primarias HUVEC como en la línea celular derivada EA.hy926 (Figuras 48 y 49).

Los ensayos de *wound healing* realizados muestran un rol importante de AQP-1 en la motilidad de células endoteliales en respuesta a SFB y Epo. Dado que no existen inhibidores farmacológicos de AQP-1 comercialmente disponibles, en los experimentos descritos en este capítulo se empleó el ión mercurio (Hg^{2+}) como inhibidor genérico de acuaporinas, debido a su capacidad de unirse al residuo Cys189 del *loop* E de este canal, bloqueando así el poro (Preston et al., 1993). La incubación con Hg^{2+} inhibió significativamente la migración inducida por SFB (Figs. 50 y 51) y por Epo (Fig.

52), sin afectar la viabilidad celular. En línea con estos resultados, el tratamiento de células EA.hy926 con un siRNA específico para AQP-1 impidió la acción promigratoria de Epo (Fig. 53). Estos hallazgos son coincidentes con los reportados por Dorward et al. (2016), quienes observaron una disminución en la migración en cultivos de la línea celular de cáncer de colon HT29 y una menor capacidad tubulogénica en células HUVEC debidas al tratamiento con el compuesto AqB013, un derivado de la bumetanida capaz de bloquear el pasaje de agua a través de AQP-1.

Existe evidencia experimental que vincula a la Epo con la modulación de acuaporinas en diferentes tejidos. En injuria por isquemia-reperfusión en ratas, Epo fue capaz de revertir la disminución de la expresión de AQP-2 renal (Wang et al., 2008), mientras que la administración de esta citoquina en un modelo de lesión cerebral por hipoxia-isquemia en ratas incrementó los niveles de AQP-4 en cerebro, aliviando el edema (Brissaud et al., 2010). En un trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, Epo revirtió la disminución de AQP-1 en la línea celular de eritroleucemia UT-7, dependiente de Epo, provocada por la privación de esta citoquina durante 18 h (Crisp et al., 2016). Los experimentos descritos en el presente capítulo sugieren que Epo es capaz de inducir la expresión de AQP-1 en células endoteliales, dado que se detectaron mayores niveles de ARNm a 24 h de tratamiento (Fig. 54) y una expresión más alta de la proteína tras 48 h de incubación (Fig. 55). Es importante resaltar que el tratamiento con el derivado carbamilo de Epo, que no presenta acción promigratoria en este tipo celular, no fue capaz de estimular este aumento en los niveles de AQP-1.

La relación entre acuaporinas y calcio es estrecha en diversos tipos celulares. Se ha demostrado la participación del Ca^{2+} en la inducción de AQP-1 en células tumorales de cáncer de próstata (Tie et al., 2012) y en células de músculo liso de la arteria pulmonar (Leggett et al., 2012), así como también su rol en la traslocación de acuaporinas a membrana, como ha sido reportado para la AQP-2 renal en respuesta a vasopresina (Chou et al., 2000) y para AQP-1 en células HEK293 enfrentadas a un estímulo hipotónico, en las cuales la redistribución de esta proteína requiere de la activación de canales TRPC (Conner et al., 2012). De acuerdo con los resultados obtenidos, el aumento de la expresión de AQP-1 por Epo involucraría un mecanismo dependiente de Ca^{2+} , como lo demuestra la coincubación con EGTA. Por otra parte, el ingreso de calcio debido a la incubación con un ionóforo de este catión fue suficiente para estimular la expresión de AQP-1 a niveles semejantes a los alcanzados con Epo (Fig. 56). Estos hallazgos concuerdan con la participación de calcio en el efecto promigratorio de Epo descrito anteriormente (Capítulo IV).

La relación entre óxido nítrico (NO) y acuaporinas también parece ser fisiológicamente relevante. Herrera y Garvin (2007) demostraron que a través de su poro central AQP-1 facilita la difusión de NO desde el endotelio hacia las fibras del músculo liso vascular, causando vasorelajación. Estos autores también reportaron un incremento en la expresión de eNOS en ratones deficientes en AQP-1, el cual compensaría la menor capacidad de transporte de NO. Por otro lado, la presencia de NO

modula la localización subcelular y la expresión de diversas acuaporinas. En este sentido, células epiteliales pulmonares de la línea MLE-12 expuestas a dadores de NO mostraron una menor expresión superficial de AQP-5 y un mayor contenido de este canal en la fracción citoplasmática, sin cambios en sus niveles de proteína en lisados celulares (Nagai et al., 2007). En forma coincidente, otros trabajos realizados *in vivo* muestran una mayor exposición de acuaporinas en membrana plasmática tras el tratamiento con el inhibidor de NOS L-NAME, si bien reportaron cambios en la expresión de estos canales de agua. Arreche et al. (2008) mostraron menores niveles de AQP-2 en túbulo colector de ratas hipovolémicas tratadas con L-NAME, mientras que Netti et al. (2016) detectaron un efecto inductor de este compuesto sobre la expresión de AQP-1 cardíaca en ratas deshidratadas, que fue, además, dependiente de la edad de los animales tratados. Las diferencias halladas entre los trabajos pueden deberse al modelo experimental estudiado, ya que en los experimentos *in vivo* distintas condiciones fisiológicas pueden afectar la relación entre el sistema del óxido nítrico y otros procesos como la regulación osmótica.

Los experimentos que se muestran en este Capítulo demostraron que en células EA.hy926 pretratadas con L-NMMA, el inhibidor de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) impide el aumento de los niveles de ARNm de AQP-1 estimulados por Epo tras 24 h de incubación, sugiriendo la participación de NO como mediador del efecto de esta citoquina (Fig. 57). Estos resultados, en conjunto con los descritos anteriormente (Capítulos III y IV), explicarían, al menos en parte, la acción promigratoria de Epo a través de la relación NO - AQP-1, de la misma manera que ocurriría con el Ca^{2+} .

Los resultados obtenidos muestran, por primera vez, la capacidad de Epo de inducir la expresión de AQP-1 en células endoteliales entre las 24 y las 48 h de tratamiento. Sin embargo, dado que el efecto promigratorio de la citoquina se observa a tiempos de incubación inferiores, sería importante determinar en el futuro si la exposición a Epo puede desencadenar cambios rápidos en la localización subcelular o en la actividad de AQP-1, con particular interés en la comparación con el efecto de cEpo. El estudio de las acuaporinas genera interés en el contexto de procesos que involucran la migración celular, tales como la angiogénesis y la metástasis, donde podría dar lugar a aplicaciones terapéuticas.

Consideraciones Finales



Los resultados presentados en este trabajo de tesis doctoral, enmarcados en el objetivo propuesto de profundizar conocimientos sobre la acción de la eritropoyetina en células endoteliales, proponen a la citoquina como un modulador de la función del endotelio, particularmente en los procesos relacionados con la angiogénesis.

Epo es reconocida como el principal factor estimulante de la eritropoyesis en médula ósea, favoreciendo la supervivencia de los progenitores eritroides, aunque también su actividad en tejidos extrahematopoyéticos ha sido reportada previamente por distintos autores. Los resultados obtenidos muestran una acción proangiogénica de Epo, manifestada a través del incremento de la proliferación, la migración, la formación de túbulos y la modificación del citoesqueleto en células endoteliales (**Figura i**).

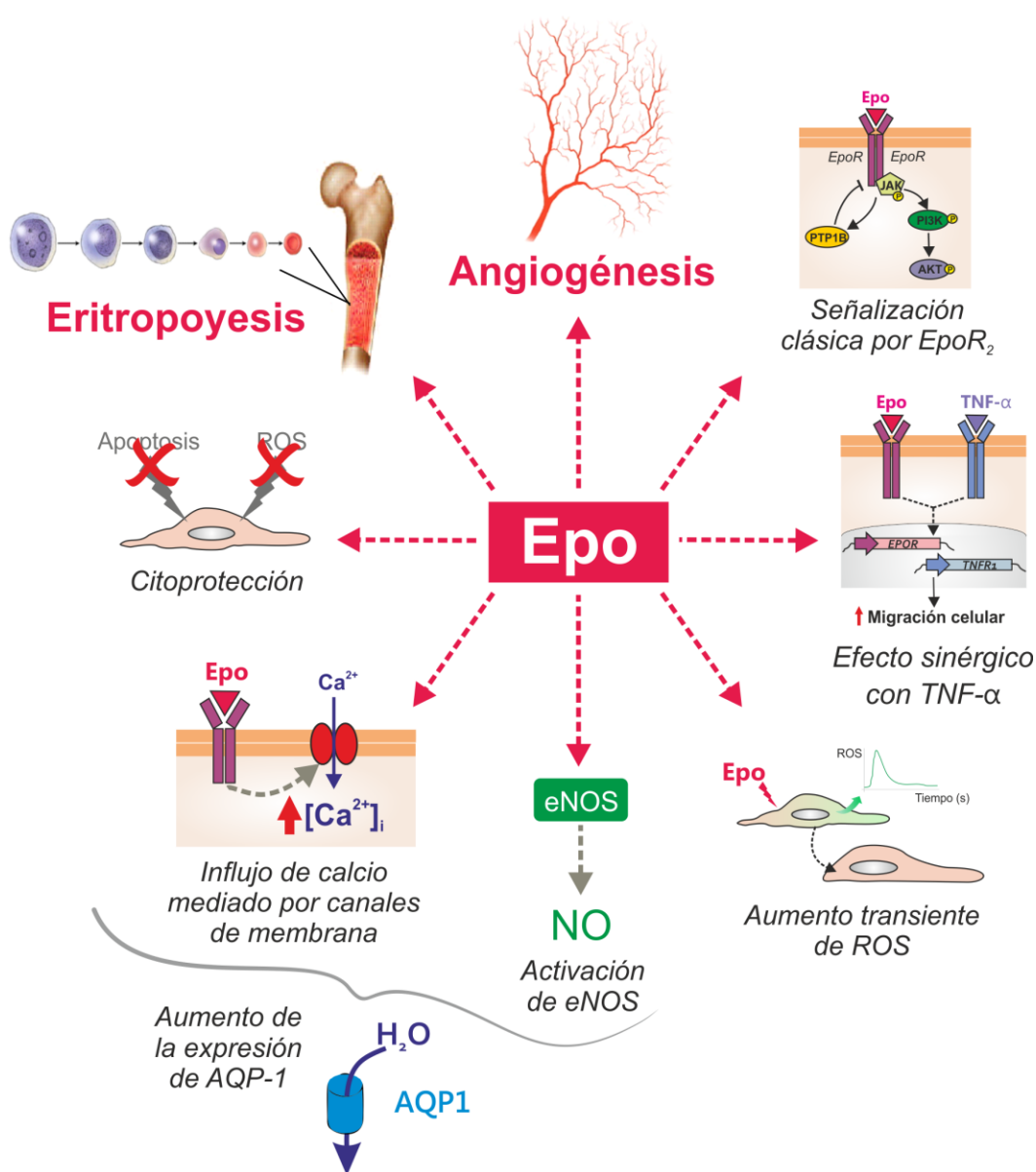


Figura i. Resumen de los resultados obtenidos sobre la actividad de eritropoyetina (Epo) en células endoteliales.

Los experimentos realizados indican que el efecto promigratorio de Epo requiere de la vía de señalización clásica mediada por el receptor EpoR₂. Esto sugiere que la citoquina puede actuar en tejidos no hematopoyéticos a través del mismo receptor que en células eritroides prescindiendo, al menos en el modelo experimental empleado, de la subunidad β -common, a diferencia de lo propuesto por otros autores.

El estudio de los mecanismos de acción subyacentes al efecto promigratorio de Epo permitió atribuir un rol a la generación transiente de especies reactivas de oxígeno, a la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial y al ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular. En este último punto, los experimentos de inhibición realizados con bloqueantes de canales de calcio no sólo sugieren la posible expresión de canales dependientes de voltaje en células endoteliales, sino que también aportan nueva información sobre la acción antiangiogénica de la amlodipina, una dihidropiridina utilizada actualmente en la clínica como antihipertensivo.

En un medio proinflamatorio generado por $\text{TNF-}\alpha$, Epo mostró un aumento en su actividad promigratoria, relacionado con una mayor expresión del receptor EpoR. A su vez, la coincubación de ambas citoquinas incrementó los niveles del receptor TNFR1. Estos resultados podrían tener importantes implicancias en el tratamiento del corazón isquémico, una patología caracterizada por un ambiente proinflamatorio que puede beneficiarse por la proliferación de vasos sanguíneos. Debido a la capacidad de la amlodipina —una droga de elección en el tratamiento de daño isquémico por su acción sobre la presión arterial— de inhibir la migración de células endoteliales inducida por Epo en estas condiciones, su administración podría contrarrestar los efectos beneficiosos de la estimulación terapéutica de la angiogénesis.

Es importante destacar que por primera vez se demostró un efecto de Epo sobre la expresión de AQP-1 en células endoteliales, dependiente del influjo de Ca^{2+} y de la producción de NO. La inhibición del efecto promigratorio de Epo por bloqueo de AQP-1, tanto por el ión Hg^{2+} como por un siRNA específico podría involucrar, además, un efecto rápido de la citoquina sobre el canal de agua, lo que motiva el estudio a futuro de los efectos de Epo sobre otros aspectos regulatorios de la acuaporina.

Como parte de los objetivos planteados en este trabajo de Tesis doctoral, se propuso dilucidar si la carbamilación de la molécula de Epo (cEpo) puede modificar la actividad biológica de la citoquina nativa en células endoteliales. Si bien se conoce la incapacidad de este derivado de Epo de estimular la eritropoyesis, su actividad en células endoteliales no había sido estudiada en profundidad anteriormente.

Los resultados informados en esta Tesis doctoral indican que la carbamilación de Epo, si bien no modifica la capacidad de la citoquina nativa de prevenir la acumulación de ROS y la apoptosis en células endoteliales, provoca la pérdida de la actividad proangiogénica de Epo (**Figura ii**). Esto

podría explicarse, al menos en parte, por el aumento de la actividad de PTP1B, tal como nuestro grupo de investigación ha reportado en células eritroides. Es importante resaltar que cEpo no fue capaz de estimular los procesos que en este trabajo han sido relacionados con la angiogénesis inducida por Epo, tales como el influjo de Ca^{2+} , la generación transiente de especies reactivas de oxígeno, y la expresión de AQP-1.

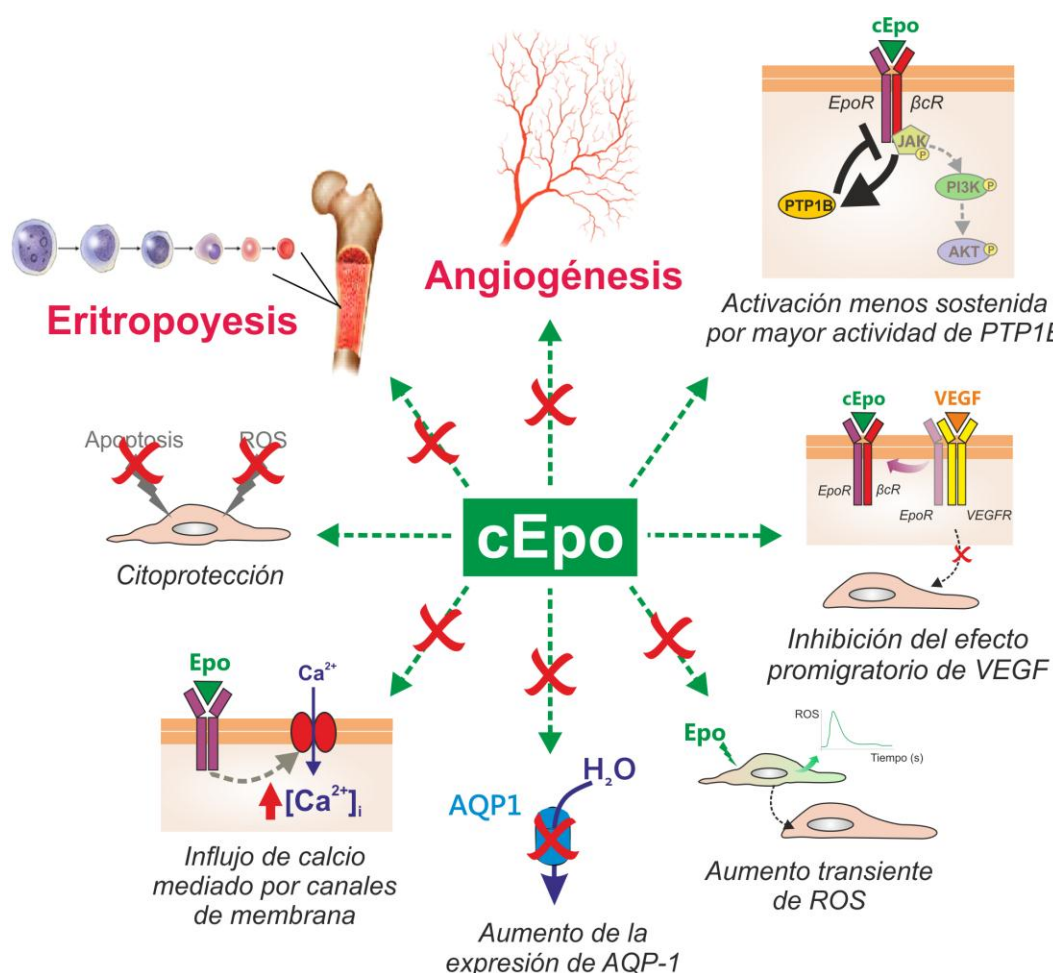


Figura ii. Resumen de los resultados obtenidos sobre la actividad de la eritropoyetina carbamilada (cEpo) en células endoteliales.

A partir de estas características de cEpo surge el interés en su posible aplicación terapéutica, ya que podría ejercer citoprotección sin estimular la angiogénesis y la eritropoyesis en pacientes donde estos procesos pudieran representar un efecto indeseado. Por otro lado, en experimentos de competencia cEpo mostró un efecto inhibitorio sobre la migración inducida por Epo o por VEGF, lo que permitiría proponer a cEpo como un posible compuesto antiangiogénico con efectos citoprotectores y sin actividad sobre el sistema hematopoyético.

Estos resultados, junto a los reportados previamente por otros autores, contribuyen al conocimiento de la acción de Epo y cEpo sobre las células endoteliales y apoyan la investigación futura para una posible aplicación terapéutica.

Referencias

- Ades E, Candal F, Swerlick R, George V, Summers S et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99: 683-690, 1992.
- Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett* 555: 72-78, 2003.
- Agre P, King L, Yasui M, Guggino W, Ottersen O et al. Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542: 3-16, 2002.
- Agre P, Saboori A, Asimos A, Smith B. Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh (D) antigen. *J Biol Chem* 262: 17497-17503, 1987.
- Ahmet I, Tae H, Juhaszova M, Riordon D, Boheler K et al. A small nonerythropoietic helix B surface peptide based upon erythropoietin structure is cardioprotective against ischemic myocardial damage. *Mol Med* 17: 194, 2011
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9: 1370–1376, 2003.
- Albini A, Morini M, Agostini FD, Ferrari N, Campelli F et al. Inhibition of angiogenesis-driven Kaposi's sarcoma tumor growth in nude mice. *Can Res* 61: 8171–8178, 2001.
- Amer J, Dana M, Fibach E. The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells. *Anemia*, 2010.
- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee E et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3974-3978, 1994.
- Anagnostou A, Lee E, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5978–5982, 1990.
- Aranda E, Owen G. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA. hy926 endothelial cell line. *Biol Res* 42: 377-389, 2009.
- Arcasoy M, Harris K, Forget B. Human erythropoietin receptor gene mutant causing familial erythrocytosis is associated with deregulation of the rates of Jak2 and Stat5 inactivation. *Exp Hematol* 27: 63–74, 1999.
- Arnaoutova I, George J, Kleinman H, Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 12: 267-274, 2009.
- Arreche N, Fellet A, López M, López-Costa J, Arranz C et al. Hypovolemic state: involvement of nitric oxide in the aged related alterations of aquaporins-2 abundance in rat kidney. *Vasc Pharmacol* 49: 19-25, 2008.
- Bauer J, Margolis M, Schreiner C, Edgell C, Azizkhan J, Lazarowski E, Juliano R. In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: Contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *J Cell Physiol* 153: 437-449, 1992.
- Beleslin-Cokic B, Cokic V, Yu X, Weksler B, Schechter A et al. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 104: 2073-2080, 2004.
- Belge H, Devuyst, O. Aquaporin-1—a water channel on the move. *Nephrology Dialysis Transplantation* 21: 2069-2071, 2006.
- Bennis Y, Guillet B, Pellegrini L. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential. *J Thromb Haemost* 10: 1914-1928, 2012.
- Berglund B, Ekblom B. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J Intern Med* 229:125-130, 1991.

- Boesch S, Nachbauer W, Mariotti C, Sacca F, Filla A et al. Safety and tolerability of carbamylated erythropoietin in Friedreich's ataxia. *Mov Disord* 29: 935-939, 2014.
- Bossu J, Elhamdani A, Feltz A. Voltage-dependent calcium entry in confluent bovine capillary endothelial cells. *FEBS Lett* 299: 239-242, 1992.
- Bouïs D, Hospers G, Meijer C, Molema G, Mulder N. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 4: 91-102, 2001.
- Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J Int Med*, 264: 405-432, 2008.
- Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci* 101: 14907-14912, 2004.
- Brines M, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle N et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10526-10531, 2000.
- Brissaud O, Villega F, Konsman J, Sanchez S, Raffard G et al. Short-term effect of erythropoietin on brain lesions and aquaporin-4 expression in a hypoxic-ischemic neonatal rat model assessed by magnetic resonance diffusion weighted imaging and immunohistochemistry. *Pediatr Res* 68: 123-127, 2010.
- Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, Galeano MR, Sansotta C et al. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol* 82: 411-417, 2002.
- Burger D, Xiang F, Hammoud L, Lu X, Feng Q. Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: H84-H93, 2009.
- Bussolino F, Ziche M, Wang J, Alessi D, Morbidelli L et al. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest* 87: 986, 1991.
- Callero M, Vota D, Chamorro M, Wenker S, Vittori D et al. Calcium as a mediator between erythropoietin and protein tyrosine phosphatase 1B. *Arch Biochem Biophys* 505: 242-249, 2011.
- Carnot P, Deflandre C. Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang. *CR Acad Sci Paris* 143: 384-387, 1906.
- Cassis P, Azzollini N, Solini S, Mister M, Aiello S et al. Both darbepoetin alfa and carbamylated erythropoietin prevent kidney graft dysfunction due to ischemia/reperfusion in rats. *Transplantation* 92: 271-279, 2011.
- Chamorro M, Maltaner R, Vittori D, Nesse A. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is involved in the defective erythropoietic function of carbamylated erythropoietin. *Int J Biochem Cell Biol* 61: 63-71, 2015.
- Chamorro M, Wenker S, Vota D, Vittori D, Nesse A. Signaling pathways of cell proliferation are involved in the differential effect of erythropoietin and its carbamylated derivative. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1833: 1960-1968, 2013.
- Chatagner A, Huppi P, Ha-Vinh Leuchter R, Sizonenko S. Erythropoietin and neuroprotection. *Arch Pediatr* 17: S78-S84, 2010.
- Chateaueux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochem Pharmacol* 82: 1291-1303, 2011.
- Chattopadhyay A, Choudhury T, Bandyopadhyay D, Datta A. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochem Pharmacol* 59: 419-425, 2000.

- Chiarugi P, Pani G, Giannoni E, Taddei L, Colavitti R et al. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion. *J Cell Biol* 161: 933-944, 2003.
- Chin H, Wakao H, Miyajima A, Kamiyama R, Miyasaka N et al. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the interleukin-3 receptor β subunit (β IL3) and recruitment of Stat5 to possible Stat5-docking sites in β IL3. *Blood* 89: 4327-4336, 1997.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou J, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125: 725-732, 1998.
- Chou C, Yip K, Michea L, Kador K, Ferraris J et al. Regulation of Aquaporin-2 Trafficking by Vasopressin in the Renal Collecting Duct. Roles of ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores and calmodulin. *J Biol Chem* 275: 36839-36846, 2000.
- Chu X, Tong Q, Cheung J, Wozney J, Conrad K et al. Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx. *J Biol Chem* 279: 1514-1522, 2004.
- Citartan M, Gopinath S, Chen Y, Lakshmipriya T, Tang T. Monitoring recombinant human erythropoietin abuse among athletes. *Biosens Bioelectron* 63: 86-98, 2015.
- Cohen J, Oren-Young L, Klingmüller U, Neumann D. Protein tyrosine phosphatase 1B participates in the down-regulation of the erythropoietin receptor signaling. *Biochem J* 377: 517-524, 2004.
- Coleman T, Westenfelder C, Tögel F, Yang Y, Hu Z et al. Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5965-5970, 2006.
- Colotta F, Bussolino F, Polentarutti N, Guglielmetti A, Sironi M et al. Differential expression of the common β and specific α chains of the receptors for GM-CSF, IL-3, and IL-5 in endothelial cells. *Exp Cell Res* 206: 311-317, 1993.
- Conner M, Conner A, Bland C, Taylor L, Brown J et al. Rapid Aquaporin Translocation Regulates Cellular Water Flow. Mechanism of hypotonicity-induced subcellular localization of aquaporin 1 water channel. *J Biol Chem* 287: 11516-11525, 2012.
- Constantinescu S, Ghaffari S, Lodish H. The erythropoietin receptor: structure, activation and intracellular signal transduction. *Trends Endocrinol Metab*, 10: 18-23, 1999.
- Crisp R, Maltaner R, Vittori D, Solari L, Gammella D et al. Red blood cell aquaporin-1 expression is decreased in hereditary spherocytosis. *Ann Hematol* 95: 1595-1601, 2016.
- Croker B, Kiu H, Nicholson S. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19: 414-422, 2008.
- Dallalio G, Law E, Means RT. Hepcidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. *Blood* 107: 2702-2704, 2006.
- Dame C. Molecular biology of the erythropoietin receptor in hematopoietic and non-hematopoietic tissues. En: Molineux G, Foote MA, Elliott SG (Eds). *Erythropoietins and Erythropoiesis* Birkhäuser Verlag/Switzerland, 2003.
- De Beuf A, Hou X, Haese P, Verhulst A. Epoetin delta reduces oxidative stress in primary human renal tubular cells. *J Biomed Biotechnol* 2010: 395785, 2010.
- Deicher R, Hörl W. Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents. *Drugs* 64: 499-509, 2004.
- Denekamp J. Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumor therapy. *Br J Cancer* 45: 136-139, 1982.
- Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher A. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477: 258-262, 2000.

- Dorward H, Du A, Bruhn M, Wrin J, Pei J. Pharmacological blockade of aquaporin-1 water channel by AqB013 restricts migration and invasiveness of colon cancer cells and prevents endothelial tube formation in vitro. *J Exp Clin Cancer Res* 35: 36, 2016.
- Du G, Zhu H, Yu P, Wang H, He J et al. SMND-309 promotes angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells through activating erythropoietin receptor/STAT3/VEGF pathways. *Eur J Pharmacol* 700: 173–180, 2013.
- d'Uscio L, Smith L, Katusic Z. Erythropoietin increases expression and function of vascular copper-and zinc-containing superoxide dismutase. *Hypertension* 55: 998-1004, 2010.
- d'Uscio L, Katusic Z. Erythropoietin increases endothelial biosynthesis of tetrahydrobiopterin by activation of protein kinase B α /Akt1. *Hypertension* 52: 93-99, 2008.
- d'Uscio L, Smith L, Santhanam A, Richardson D, Nath K et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin. *Hypertension* 49: 1142-1148, 2007.
- Edgell C, Haizlip J, Bagnell C, Packenham J, Harrison P et al. Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA. hy926. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 1167-1172. 1990
- Edgell C, McDonald C, Graham J. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3734–3737, 1983.
- Elliott S, Sinclair A. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biol Targets Ther* 163, 2012.
- Emeis J and Edgell, C. Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy926). *Blood* 71: 1669-1675, 1988.
- Fares H, Di Nicolantonio J, O'Keefe J, Lavie C. Amlodipine in hypertension: a first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes, *Open Heart* 3: e000473, 2016.
- Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist*, 9: 18-30, 2004.
- Folkman J, Shing Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. En: Lindahl U, Björk I (Eds). *Heparin and related polysaccharides*. Springer US, 1992.
- Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2604-2609, 2001.
- Galley H, Webster, N. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 93: 105-113, 2004.
- Gao C, Tang J, Li R, Huan J. Specific inhibition of AQP1 water channels in human pulmonary microvascular endothelial cells by small interfering RNAs. *J Trauma Acute Care Surg* 72: 150-161, 2012.
- Gao B, Saba T, Tsan M. Role of $\alpha\beta 3$ -integrin in TNF- α -induced endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1196-C1205, 2002.
- Ge R, Tai Y, Sun Y, Zhou K, Yang S et al. Critical role of TRPC6 channels in VEGF-mediated angiogenesis. *Cancer Lett* 283: 43–51, 2009.
- Giannone H, Rondé P, Gaire M, Beaudouin J, Haiech J et al. Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J Biol Chem* 279: 28715-28723, 2004.
- Goldstein B, Bittner-Kowalczyk A, White M, Harbeck, M. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J Biol Chem* 275: 4283-4289, 2000.
- Guneli E, Cavdar Z, Islekel H, Sarioglu S, Erbayraktar S et al. Erythropoietin protects the intestine against ischemia/reperfusion injury in rats. *Mol Med* 13: 509-517, 2007.

- Harfouche R, Malak N, Brandes R, Karsan A, Irani K et al. Roles of reactive oxygen species in angiopoietin-1/tie-2 receptor signaling. *FASEB J* 19: 1728-1730, 2005.
- Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102: 1340–1346, 2003.
- Heikal L, Ghezzi P, Mengozzi M, Stelmaszczuk B, Feelisch et al. Erythropoietin and a nonerythropoietic peptide analog promote aortic endothelial cell repair under hypoxic conditions: role of nitric oxide. *Hypoxia* 4: 121-133, 2016.
- Herrera M, Garvin J. Novel role of AQP-1 in NO-dependent vasorelaxation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292: F1443-F1451, 2007.
- Higgins R, Yu K, Sanders R, Nandgaonkar B, Rotschild T et al. Diltiazem reduces retinal neovascularization in a mouse model of oxygen induced retinopathy. *Cur Eye Res* 18: 20-27, 1999.
- Holstein J, Menger M, Scheuer C, Meier C, Culemann U et al. Erythropoietin (EPO)—EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci* 80: 893-900, 2007.
- Hoque M, Soria J, Woo J, Lee T, Lee J et al. Aquaporin 1 is overexpressed in lung cancer and stimulates NIH-3T3 cell proliferation and anchorage-independent growth. *Am J Pathol* 168: 1345-1353, 2006.
- Hu J, Verkman A. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *FASEB J* 20: 1892-1894, 2006.
- Huber TL, Kouskoff V, Fehling HJ, Palis J, Keller G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 432: 625-630, 2004.
- Imai N, Higuchi M, Kawamura A, Tomonoh K, Oh-Eda et al. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. *Eur J Biochem* 194: 457-462, 1990.
- Imamura R, Okumi M, Isaka Y, Ichimaru N, Moriyama T et al. Carbamylated erythropoietin improves angiogenesis and protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury. *Cell Transplant* 17: 135-141, 2008.
- Iwai M, Stetler R, Xing J, Hu X, Gao Y et al. Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke* 41: 1032–1037, 2010.
- James C, Ugo V, Le Couedic J, Staerk J, Delhommeau F et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144–1148, 2005.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill S, Kaufman R et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-810, 1985.
- Jain R. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature medicine* 7: 987-989, 2001.
- Jelkmann, W. Molecular biology of erythropoietin. *Int Med* 43: 649-659, 2004.
- Jubinsky P, Krijanovski O, Nathan D, Tavernier J, Sieff C. The β chain of the Interleukin-3 Receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* 90: 1867-1873, 1997.
- Kang B, Kin J, Cae Y, Lee S, Sohn S et al. AQP1 expression and survival in patients with colon cancer. *J Clin Oncol* 32: e14586-e14586, 2014.
- Kashii Y, Uchida M, Kirito K, Tanaka M, Nishijima K et al. A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 96: 941–949, 2000.
- Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E et al. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 46: 678-684, 2014.

- Kawachi K, Iso Y, Sato T, Wakabayashi K, Kobayashi Y et al. Effects of erythropoietin on angiogenesis after myocardial infarction in porcine. *Heart Vessels* 27: 79-88, 2012.
- Kirito K, Uchida M, Takatoku M, Nakajima K, Hirano T et al. A novel function of Stat1 α and Stat3 proteins in erythropoietin-induced erythroid differentiation of a human leukemia cell line. *Blood* 92: 462-471, 1998.
- Klingmüller U, Lorenz U, Cantley L, Neel B, Lodish H. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80: 729-738, 1995.
- Komatsu N, Nakauchi H, Miwa A, Ishihara T, Eguchi M et al. Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer Res* 51: 341-348, 1991.
- Kumamoto H, Okamoto H, Watanabe M, Onozuka H, Yoneya K et al. Beneficial effect of myocardial angiogenesis on cardiac remodeling process by amlodipine and MCI-154. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: 1117-1123, 1999.
- Labrecque L, Royal I, Surprenant D, Patterson C, Gingras D et al. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 14: 334-347, 2003.
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly for the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- Lamalice L, Le Boeuf F, Huot. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Research* 100: 782-794, 2007.
- Lanahan A, Lech D, Dubrac A, Zhang J, Zhuang Z et al. PTP1b is a physiologic regulator of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circulation* 130: 902-909, 2014.
- Lee M, Lee J, Lee J. Prevention of erythropoietin-associated hypertension. *Hypertension* 50: 439-445, 2007.
- Lee J, Ishihara A, Oxford H, Johnson B, Jacobson K. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* 400: 382-386, 1999.
- Lee S, Kwon, K, Kim SR, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 273: 15366-15372, 1998.
- Ledoux J, Werner M, Brayden J, Nelson M. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* 21: 69-78, 2006.
- Leggett K, Maylor J, Undem C, Lai N, Lu W et al. Hypoxia-induced migration in pulmonary arterial smooth muscle cells requires calcium-dependent upregulation of aquaporin 1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303: L343-L353, 2012.
- Lei H, Quelle F. FOXO transcription factors enforce cell cycle checkpoints and promote survival of hematopoietic cells after DNA damage. *Mol Cancer Res* 7: 1294-1303, 2009.
- Leist M. Derivatives of Erythropoietin That Are Tissue Protective But Not Erythropoietic. *Science* 305: 239-242, 2004.
- Mak I, Boehme O, Weglicki W. Antioxidant Effects of Calcium Channel Blockers Against Free Radical Injury in Endothelial Cells Correlation of Protection With Preservation of Glutathione Levels. *Circ. Res.* 70: 1099-1103, 1992.
- Maniatis N, Brovkovich V, Allen S, John T, Shajahan A et al. Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circ Res* 99: 870-877, 2006

- Mason R, Walter M, Trumbore M, Olmstead Jr E, Mason P. Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amlodipine. *J Mol Cell Cardiol* 31: 275-281, 1999.
- Mattio M, Ceaglio N, Oggero M, Perotti N, Amadeo I et al. Isolation and characterization of a subset of erythropoietin glycoforms with cytoprotective but minimal erythropoietic activity. *Biotechnol Prog* 27: 1018-1028, 2011.
- Maurice T, Mustafa M, Desrumaux C, Keller E, Naert G et al. Intranasal formulation of erythropoietin (EPO) showed potent protective activity against amyloid toxicity in the A β 25-35 non-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Psychopharmacol* 27: 1044-1057, 2013.
- Maxwell P, Ferguson D, Osmond M, Pugh C, Heryet A et al. Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood* 84: 1823-1830, 1994.
- Maxwell P, Osmond M, Pugh C, Heryet A, Nicholls L et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 44: 1149-1162, 1993.
- Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development* 138: 1017-1031, 2011.
- Migliati E, Meurice N, DuBois P, Fang J, Somasekharan S et al. Inhibition of aquaporin-1 and aquaporin-4 water permeability by a derivative of the loop diuretic bumetanide acting at an internal pore-occluding binding site. *Mol Pharmacol* 76: 105-112, 2009.
- Mikirova N, Ichim T, Riordan N. Anti-angiogenic effect of high doses of ascorbic acid. *J Transl Med* 6: 50, 2008.
- Miller C, Urban N, Blau C. Quantitative comparison of erythropoietin receptor levels in the epithelial versus endothelial fractions of primary breast tumors. *Anticancer Res* 31: 1189-1195, 2011.
- Miller B, Scaduto Jr R, Tillotson D, Botti J, Cheung J. Erythropoietin stimulates a rise in intracellular free calcium concentration in single early human erythroid precursors. *J Clin Invest* 82: 309-315, 1988.
- Miura S, Fujino M, Matsuo Y, Tanigawa H, Saku K. Nifedipine-induced vascular endothelial growth factor secretion from coronary smooth muscle cells promotes endothelial tube formation via the kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase-1/NO pathway. *Hypertens Res* 28: 147-153, 2005.
- Miyake T, Kung C, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252: 5558-5564, 1977.
- Monzani E, Bazzotti R, Perego C, La Porta C. AQP1 is not only a water channel: it contributes to cell migration through Lin7/beta-catenin. *PLoS One* 4: e6167, 2009.
- Moon C, Krawczyk M, Paik D, Coleman T, Brines, M et al. Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 999-1005, 2006.
- Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D et al. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11612-11617, 2003.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P et al. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407: 599-605, 2000.
- Nagai K, Watanabe M, Seto M, Hisatsune A, Miyata T et al. Nitric oxide decreases cell surface expression of aquaporin-5 and membrane water permeability in lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 579-584, 2007

- Nagata Y, Takahashi N, Davis R, Todokoro K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* 92: 1859–1869, 1998.
- Nakamura Y, Patrushev N, Inomata H, Mehta D, Urao N et al. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell–cell adhesions in endothelial cells. *Circ Res* 102: 1182–1191, 2008.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113: 1271, 2004.
- Netti V, Iovane A, Vatrella M, Zotta E, Fellet A et al. Effects of nitric oxide system and osmotic stress on Aquaporin-1 in the postnatal heart. *Biomed Pharmacother* 81: 225–234, 2016.
- Ng T, Marx G, Littlewood T, Macdougall, I. Recombinant erythropoietin in clinical practice. *Postgrad Med J* 79: 367–376, 2003.
- Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81: 1415–1459, 2001.
- Nishizawa T, Cheng X, Jin Z, Obata K, Nagata K et al. Ca²⁺ channel blocker benidipine promotes coronary angiogenesis and reduces both left-ventricular diastolic stiffness and mortality in hypertensive rats. *J Hypertens* 28: 1515–1526, 2010.
- Park K, Mun K, Chang E, Park S, Kim H. Inhibition of erythropoietin activity by cyanate. *Scand J Urol Nephrol* 38: 69–72, 2004.
- Pietrement C, Gorisse L, Jaisson S, Gillery P. Chronic increase of urea leads to carbamylated proteins accumulation in tissues in a mouse model of CKD. *PloS one* 8: e82506, 2013.
- Preston G, Jung J, Guggino W, Agre, P. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol Chem* 268: 17–20, 1993.
- Qin F, Zhang H, Shao Y, Liu X, Yang L et al. Expression of aquaporin1, a water channel protein, in cytoplasm is negatively correlated with prognosis of breast cancer patients. *Oncotarget* 7: 8143–8154, 2016.
- Ramírez R, Carracedo J, Nogueras S, Buendia P, Merino A et al. Carbamylated darbepoetin derivative prevents endothelial progenitor cell damage with no effect on angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 47: 781–788, 2009.
- Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *in vivo*. *Blood* 93: 2627–2636, 1999.
- Rousseau S, Houle F, Landry J, Landry J, Huot, J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15: 2169–2177, 1997.
- Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J et al. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res* 65: 719–727, 2005.
- Saadoun S, Papadopoulos M, Hara-Chikuma M, Verkman A. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 434: 786–792, 2005.
- Saadoun S, Papadopoulos M, Davies D, Bell B, Krishna S. Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *Br J Cancer* 87: 621–623, 2002.
- Scalera F, Martens-Lobenhoffer J, Täger M, Bukowska, A, Lendeckel et al. Effect of L-arginine on asymmetric dimethylarginine (ADMA) or homocysteine-accelerated endothelial cell aging. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 1075–1082, 2005.

- Saijonmaa O, Nyman T, Hohenthal U, Fyhrquist F. Endothelin-1 is expressed and released by a human endothelial hybrid cell line (EA.hy926). *Biochem Biophys Res Commun* 181: 529-536, 1991.
- Santhanam A, Smith L, Nath K, Katusic ZS. In vivo stimulatory effect of erythropoietin on endothelial nitric oxide synthase in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H781-H786, 2006.
- Sautina L, Sautin Y, Beem E, Zhou Z, Schuler A et al. Induction of nitric oxide by erythropoietin is mediated by the β common receptor and requires interaction with VEGF receptor 2. *Blood* 115: 896-905, 2010.
- Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H et al. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc* 36: 147-156, 2003.
- Schwab A. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F739-F747, 2001.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T, Gertsenstein M, Wu X et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66, 1995.
- Shu Q, Amin M, Ruth J, Campbell P, Koch A. Suppression of endothelial cell activity by inhibition of TNF α . *Arthritis Res Ther* 14: R88, 2012.
- Shyy J, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* 91: 769-775, 2002.
- Spivak J. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat Rev Cancer* 5: 543-555, 2005.
- Stevenson M. Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nat Rev Immunol* 3: 851-858, 2003.
- Sturm B, Helminger M, Steinkellner H, Heidari M, Goldenberg H et al. Carbamylated erythropoietin increases frataxin independent from the erythropoietin receptor. *Eur J Clin Invest* 40: 561-565, 2010.
- Su K, Shyue S, Kou Y, Ching L, Chiang A et al. β common receptor integrates the erythropoietin signaling in activation of endothelial nitric oxide synthase. *J Cell Physiol* 226: 3330-3309, 2011.
- Suggs J, Madden M, Friedman M, Edgell, C. Prostacyclin expression by a continuous human cell line derived from vascular endothelium. *Blood* 68: 825-829, 1986.
- Taoufik E, Petit E, Divoux D, Tseveleki V, Mengozzi M et al. TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. *Proc Nat Acad Sci USA* 105: 6185-6190, 2008.
- Thornhill M, Li J, Haskard, D. Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926. *Scand J Immunol* 38: 279-286, 1993.
- Tie L, Lu N, Pan X, Pan Y, An Y. Hypoxia-induced up-regulation of aquaporin-1 protein in prostate cancer cells in a p38-dependent manner. *Cel Physiol Biochem* 29: 269-280, 2012.
- Toba H, Kojima Y, Wang J, Noda K, Tian W et al. Erythropoietin attenuated vascular dysfunction and inflammation by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in nitric oxide synthase-inhibited hypertensive rat aorta. *Eur J Pharmacol* 691: 190-197, 2012.
- Tobu M, Iqbal O, Fareed D, Chatha M, Hoppensteadt, D et al.. Erythropoietin-induced thrombosis as a result of increased inflammation and thrombin activatable fibrinolytic inhibitor. *Clin Appl Thromb Hemost* 10: 225-232, 2004.
- Toma L, Stancu C, Sanda G, Sima A. Anti-oxidant and anti-inflammatory mechanisms of amlodipine action to improve endothelial cell dysfunction induced by irreversibly glycated LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 411: 202-207, 2011.

- Tong Q, Hirschler-Laszkiewicz I, Zhang W, Conrad K, Neagley D et al. TRPC3 is the erythropoietin-regulated calcium channel in human erythroid cells. *J Biol Chem* 283: 10385–10395, 2008.
- Tramontano A, Muniyappa R, Black A, Blendea M, Cohen I et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 990–994, 2003.
- Trincavelli M, Da Pozzo E, Ciampi O, Cuboni S, Daniele S et al. Regulation of erythropoietin receptor activity in endothelial cells by different erythropoietin (EPO) derivatives: an in vitro study. *Int J Mol Sci* 14: 2258-2281, 2013.
- Ueba H, Brines M, Yamin M, Umemoto T, Ako J et al. Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin. *Proc Nat Acad Sci USA* 107: 14357-14362, 2010.
- Verkman A. Aquaporins in endothelia. *Kidney Int* 69: 1120-1123, 2006.
- Verkman A. Aquaporin water channels and endothelial cell function. *J Anat* 200: 617-627, 2002.
- Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*. 198: 971-975, 2003.
- Vinet R, Vargas F. L- and T-type voltage-gated Ca^{2+} currents in adrenal medulla endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H1313–H1322, 1999.
- Vogel V, Kramer H, Bäcker A, Meyer-Lehnert H, Jelkmann W et al. Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells. *Am J Hypertens* 10: 289-296, 1997.
- Wada Y, Kato S, Okamoto K, Izumaru S, Aoyagi S et al. Diltiazem, a calcium antagonist, inhibits matrix metalloproteinase-1 (tissue collagenase) production and collagenolytic activity in human vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med* 8: 561-566, 2001.
- Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C et al. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 105: 600-608, 2005.
- Wang L, Chopp M, Teng H, Bolz M, Francisco MA et al. Tumor necrosis factor α primes cerebral endothelial cells for erythropoietin-induced angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 31: 640-647, 2011.
- Wang Y, Zang Q, Liu Z, Wu Q, Maass D et al. Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol* 301: C695-C704, 2011.
- Wang W, Li C, Summer S, Falk S, Wang W. Role of AQP1 in endotoxemia-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Ren Physiol*, 294: F1473-F1480, 2008.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35: 1732-1737, 2004.
- Wang F, Kung C, Goldwasser E. Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology* 116: 2286–2292, 1985.
- Wen T, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu P, Nakata K et al. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res* 67: 795–803, 2002.
- Wenker S, Chamorro M, Vota D, Callero M, Vittori D et al. Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells. *J Cel Biochem* 110: 151-161, 2010.

- Wu R, Xu Y, Ma Z, Nwariaku F, Sarosi G et al. Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. *J Cell Biol* 171: 893-904, 2005.
- Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, Meng Y, Zhang Z et al. Effects of posttraumatic carbamylated erythropoietin therapy on reducing lesion volume and hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome in rats following traumatic brain injury. *J Neurosurg* 114: 549-559, 2011.
- Yakubu M, Leffler C. L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels in cerebral microvascular endothelial cells and ET-1 biosynthesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1687-C1695, 2002.
- Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T et al. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *FEBS J* 239: 494-500, 1996.
- Yang Z, Wang H, Jiang Y, Hartnett M E. VEGFA activates erythropoietin receptor and enhances VEGFR2-mediated pathological angiogenesis. *Am J Pathol* 84: 1230-1239, 2014.
- Yang W, Chang J, Han N, Park S. Darbepoetin alfa suppresses tumor necrosis factor- α -induced endothelin-1 production through antioxidant action in human aortic endothelial cells: role of sialic acid residues. *Free Radic Biol Med* 50: 1242-1251, 2011.
- Yang B, Kim J, Verkman A. Comparative efficacy of HgCl_2 with candidate aquaporin-1 inhibitors DMSO, gold, TEA⁺ and acetazolamide. *FEBS lett* 580: 6679-6684, 2006.
- Yu J, Zhuang Z, Drinane M, Kauser K, Rubanyi G et al. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *Proc Nat Acad Sci* 102: 10999-11004, 2005.
- Yue H, Uzui H, Shimizu H, Nakano A, Mitsuke Y et al. Different effects of calcium channel blockers on matrix metalloproteinase-2 expression in cultured rat cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 223-230, 2004.
- Zafarullah M, Li W, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60: 6-20, 2003.
- Zeuthen T. How water molecules pass through aquaporins. *Trends Biochem Sci* 26: 77-79, 2001.