



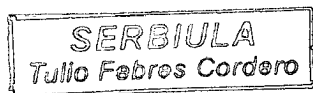
UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
MERIDA VENEZUELA

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE MEDICINA

POSTGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS FUNDAMENTALES

**Participación del Factor de Crecimiento Epidérmico
(EGF) y del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
(VEGF) en el Proceso de Transición Endotelio-
Mesénquima en células embrionarias: Posibles rutas
de señalización.**



Autora: Lic. Luz Marina Carrillo P.

Tutor: Enrique Arciniegas, PhD.

Mérida, Venezuela

Marzo de 2012

RESUMEN

En este estudio demostramos que la adhesión a la fibronectina y la organización de monocapas de células endoteliales aórticas obtenidas de embrión de pollo, en presencia de Ca^{2+} y ausencia de factores de crecimiento es mediada por la integrina β_3 , un receptor ampliamente expresado sobre la superficie apical de células endoteliales. También reportamos que la adición del factor de crecimiento epidérmico (EGF) o TGF- α y bajas concentraciones de suero de pollo (0,1% SP) a monocapas de células endoteliales, promovieron la pérdida de los contactos célula-célula, su separación del sustrato y eventual migración que resultaron en cambios en la distribución espacial y organización no solo de la integrina β_3 , sino también de β -catenina, p120-catenina, c-Src y de los microtúbulos. Todos estos eventos celulares son considerados necesarios durante la progresión del proceso de transición endotelio-mesénquima (TEndoM). De manera interesante la adhesión de células endoteliales a la fibronectina en ausencia de factores de crecimiento estuvo acompañada de activación y translocación nuclear de los receptores del EGF, específicamente EGFR y ErbB2; esto fue demostrado mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra los residuos fosforilados Tyr845 y Tyr877, respectivamente. Adicionalmente, demostramos que EGF, TGF- α , EGFR y ErbB2 están presentes en la pared aórtica de embriones pollo de 12-14 días de desarrollo cuando los engrosamientos de la íntima son notorios y el proceso de TEndoM ocurre.

Tomados en conjunto, estos hallazgos indican que la adhesión de las células endoteliales a la FN mediada por integrina y la activación y translocación de c-Src, EGFR y ErbB2 así como la presencia de sus ligandos, son requeridas para el proceso de TEndoM.

DEDICATORIA

A mis padres por haberme dado la vida, por compartir conmigo los momentos mas bellos y difíciles, por creer en mi, por apoyarme siempre. Mi madre a la cual nunca olvidaré el amor que me brindó y que ilumina y bendice desde el cielo mi día a día; mi padre por enseñarme lo bonito de la vida, por su paciencia, comprensión, compañía e inagotable apoyo para mi y mis hermanos, gracias Joche por ser el mejor padre del mundo, disfruta de este triunfo porque es tuyo también.

www.bdigital.ula.ve

INDICE

RESUMEN.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
DEDICATORIA.....	4
ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Marco Teórico.....	13
2. Objetivo General.....	21
2.1 Objetivos Específicos: Estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Obtención de explantes aórticos.....	23
3.2 Ensayos de adhesión celular.....	23
3.3 Cultivos celulares.....	24
3.4 Ensayos de estimulación con EGF en cultivos primarios de células endoteliales.....	24
3.5 Inmunofluorescencia.....	25
3.6 Inmunoperoxidasa <i>in vitro</i>	26

3.7	Análisis por citometría de flujo de las formas fosforiladas de EGFR (Tyr 845) y ErbB2 (Tyr877) en células endoteliales embrionarias.....	27
3.8	Obtención de segmentos de aortas para cortes en parafina.....	28
3.9	Inmunoperoxidasa en cortes desparafinados.....	29
3.10	Ensayos de estimulación con VEGF en cultivos primarios de células endoteliales.....	30
3.11	Resumen de anticuerpos.....	32
4.	RESULTADOS.....	34
4.1	Efectos del Ca²⁺ sobre la adhesión de las células endoteliales.....	34
4.2	La adhesión de las células endoteliales a la FN en presencia de Ca²⁺ y ausencia de suero o factores de crecimiento es mediada por la integrina β_3 y la adición de EGF o TGF-α produce cambios en la distribución y organización de esta integrina.....	37
4.3	Inmunolocalización de integrina β_1 y p-FAK <i>in vitro</i>.....	38
4.4	Activación parcial de EGFR y ErbB2/Neu mediada por integrina β_3 es aumentada por la adición de EGF o TGF-α y baja concentración de suero de pollo.....	39
4.5	Inmunolocalización <i>in vitro</i> de p-c-Src (Tyr416).....	40
4.6	Inmunolocalización <i>in vivo</i> de EGF, TGF-α, EGFR y ErbB2/Neu.....	41
4.7	Efectos de VEGF sobre cultivos primarios de células endoteliales embrionarias.....	42
5.	DISCUSION.....	44
5.1	CONCLUSIONES.....	53

5.2 PERSPECTIVAS 54

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 55

www.bdigital.ula.ve

ABREVIATURAS.

BSA= albúmina de suero de bovino

CEs: células endoteliales

CMLs: células musculares lisas

CNMLs: células no musculares lisas

c-Src: forma citoplásmica de Src

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGTA= Ácido Etilenglicoltetracético.

FACs: clasificación celular por fluorescencia

FAK: kinasa de adhesiones focales

FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico tipo-2

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FN: fibronectina

HB-EGF: factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina

HRP: peroxidasa de rábano

IGF-II: factor de crecimiento de la insulina tipo II

L= Luz del vaso

MEC: matriz extracelular

MLS: medio 199 libre de suero

MTs: microtúbulos

NRTKs: no receptores con actividad tirosina kinasa

PBS: tampón salino de fosfato

rhEGF : recombinante de humano del factor de crecimiento epidérmico

rhTGF- α recombinante de humano del factor de crecimiento y transformación alfa

RTKs: receptores con actividad tirosina kinasa

SP= suero de pollo

Src: Sarcoma de Rous, celular

TEM: transición epitelio - mesénquima

TEndoM: transición endotelio - mesénquima

TGF- α : factor de crecimiento y transformación alfa

TGF- β : factor de crecimiento y transformación-beta

TRICT: isotiocianato de tetrametil rodamina

Tyr: residuo de tirosina

UAs: uniones adherentes

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

vWf: factor von Willebrand

α -ML actina: Alfa-Músculo liso actina

1. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista histológico, la pared arterial está conformada por ciertos tipos celulares entre los que se destacan las células endoteliales (CEs) las cuales aparecen rodeadas de múltiples capas concéntricas de células musculares lisas (CMLs), así como de células no musculares lisas (CNMLs). En las grandes arterias, en particular, las arterias elásticas o arterias de gran calibre tales como la aorta, el tronco pulmonar con sus respectivas arterias pulmonares, la arteria carótida, la arteria subclavia y las arterias coronarias, la pared está compuesta (vista de adentro hacia fuera) de: a) la túnica íntima, la región más interna de la pared del vaso, en cuyo extremo luminal se observan las células endoteliales poligonales unidas entre sí por complejos de uniones muy particulares (las llamadas uniones adherentes y oclusivas) y adheridas a una lámina basal en la mayoría de los casos. Próxima a esta lámina existe una región que consiste de una matriz extracelular (MEC) en la cual están embebidas algunas CMLs y CNMLs y que tiene como límite inferior a la lámina elástica interna, la cual como su nombre lo indica, está compuesta de fibras de elastina bien definidas. b) La túnica o región media, la cual consiste básicamente de CMLs rodeadas por pequeñas fibras de elastina, paquetes de fibras de colágeno generalmente del tipo I y III y de otros componentes de MEC dispuestos en forma circular. c) Finalmente, la túnica adventicia, la cual se observa disminuida en su espesor en comparación con las dos túnicas anteriores. Esta túnica está conformada de abundante MEC en la cual están localizadas algunas células fibroblásticas y pequeños vasos sanguíneos (*vasa vasorum*) (ver Diagrama).

Los vasos sanguíneos no son estructuras estáticas; por el contrario, ellos están sujetos a un continuo remodelado en su estructura y arquitectura. Este remodelado parece ocurrir durante el desarrollo vascular, así como también en muchas patologías vasculares las cuales se manifiestan no solo durante la vida de adulto sino también en la infancia y en la adolescencia (Gibbond y Dzau, 1994; Stehbens, 1996). La remodelación vascular involucra crecimiento, migración, muerte celular, degradación y reorganización de la MEC y es regulado por fuerzas biomecánicas que están asociados con el flujo sanguíneo

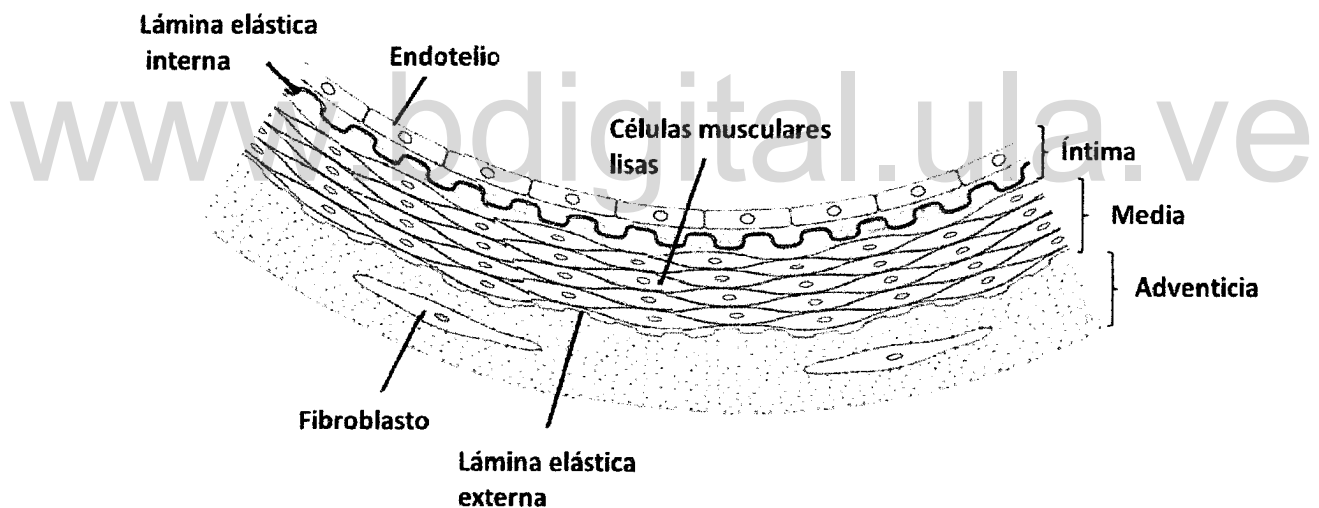


Diagrama. Representación esquemática de la pared arterial.

(hemodinamia), así como también por factores ambientales y genéticos (Hann y Schwartz, 2009; Davies, 2009). El flujo sanguíneo es hoy en día considerado como un factor epigenético importante en el desarrollo y funcionamiento del sistema cardiovascular. El genera una serie de fuerzas biomecánicas tales como la llamada fuerza de fricción o shear stress, la fuerza de compresión y la

de tensión. Estas fuerzas actúan sobre la pared del vaso modulando a corto plazo no solo la estructura y función endotelial, sino también la organización y diferenciación de los vasos sanguíneos en etapas embrionarias, el tono o calibre vascular, la reparación endotelial y a largo plazo el remodelado del corazón y de las grandes arterias (Tarbell y Ebong, 2008).

Es ampliamente conocido que las alteraciones en la hemodinamia pueden causar también el engrosamiento de la íntima (Stary y col., 1995; Davies y Triphatti, 1993; Glasser y Arnett, 2008). Este último es definido como un aumento en el número de células residentes en la íntima, el cual ocurre concomitantemente con la degradación y reorganización de los componentes de MEC (Nakashima y col., 2002; Subbotin, 2007). La formación de tales engrosamientos puede involucrar factores del microambiente tales como algunas citocinas y factores de crecimiento, la modulación de la expresión de algunos genes así como algunos eventos celulares como la migración y proliferación celular (Newby y Zaltsman, 2000). En la actualidad existe controversia no solo con respecto a la naturaleza y origen o la fuente de CMLs involucradas en el desarrollo de la pared arterial (Majesky, 2007) y de las células que conforman los engrosamientos de la íntima (Hoofnagle y col., 2006), sino también en relación a los mecanismos que contribuyen a su formación (Arciniegas y col., 2007; Arciniegas y Candelle, 2008; Carrillo y col., 2010). Algunos investigadores sostienen que estos cambios son causados por la acción de las células musculares lisas residentes en la pared del vaso, que proliferan y migran desde la región media a la íntima (Fleenor y col., 2011). Sin embargo, estudios recientes han propuesto diferentes orígenes o fuentes para

las células que forman parte de la íntima engrosada que incluyen a las células hematopoyéticas circulantes o CMLs locales (Eisenberg y Eisenberg, 2004). Otras fuentes podrían incluir a las células epicárdicas (Majesky., 2007), o al endotelio por un proceso de transición endotelio-mesénquima (TEndoM), un proceso a través del cual un grupo de células endoteliales pierden su fenotipo y se transforman en células mesenquimáticas y/o células musculares lisas (Arciniegas y col, 2007; Bautch, 2011; Carrillo y col., 2010; Medici y col., 2010). Como suele ocurrir en el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM), la transición endotelial parece progresar a través de una serie de pasos importantes cuya interdependencia y orden todavía no están claros (Arciniegas y col., 2007; Arciniegas y Candelle, 2008; Baum y col., 2008; Carrillo y col., 2010). Este es un proceso complejo que involucra la adhesión celular, síntesis y secreción de factores de crecimiento y citocinas, activación de receptores con actividad tirosina kinasa (RTKs) y no receptores tirosina kinasas (NRTKs), reorganización del citoesqueleto, pérdida gradual de la polaridad endotelial y de los contactos célula-célula o uniones adherentes (UAs), secreción de proteasas y fosfatasas, remodelado de la matriz extracelular, separación de las células del sustrato, migración y diferenciación celular (Arciniegas y col., 2007; Carrillo y col., 2010).

1.1 Marco teórico

La producción excesiva de algunos factores de crecimiento y/o la activación exacerbada de sus receptores tirosinas kinasas que afectan la adhesión de las células epiteliales a la matriz extracelular (MEC) y por ende los contactos entre ellas y su polaridad ha sido consistentemente reportada en aquellos sitios

donde las células epiteliales se transforman en células mesenquimáticas (TEM), como suele ocurrir durante el desarrollo embrionario y en la progresión del cáncer (Floor y col., 2011; Guarino, 2007; Lee y col., 2006; Polyak y Weinberg, 2009; Radisky y col., 2005; Savagner y col., 2001; Thiery y col., 2006). Es ampliamente conocido que la adhesión de las células a la MEC es un requisito importante en la determinación de la forma, migración, proliferación, diferenciación celular, así como en la expresión de algunos genes. (Geiger y Yamada., 2011; Papusheva y Heisenberg, 2010). Además de este papel, la adhesión célula-MEC promueve varias vías de señalización intracelular modulando de esta manera la apoptosis y el crecimiento tumoral (Geiger y Yamada, 2011). De igual modo, las células usan un número importante de receptores de superficie que propician la adhesión célula-MEC, siendo la familia de las integrinas una de las más estudiadas. Estas proteínas transmembranales heterodiméricas también promueven la activación de los RTKs, regulando así múltiples funciones biológicas. (Jean y col., 2011; Schwartz., 2010). Es importante señalar que el enlace de las integrinas a sus respectivos ligandos es dependiente de la presencia de cationes divalentes tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} y que algunos estímulos mecánicos como las fuerzas de fricción (shear stress), de compresión y tensión promueven el agrupamiento de las integrinas lo cual produce el reclutamiento y la activación de otras moléculas de señalización celular que incluye a los RTKs, controlando así la apoptosis, proliferación y migración celular (Guo y Giancotti, 2004; Ivaska y Heino., 2010; Streuli y Akhtar., 2009; Yamada y Even-Ram, 2002). Cabe destacar que factores de crecimiento que activan a los RTKs pueden modular también algunos de estos eventos celulares que suelen ser mediados por las

integrinas (Streuli y Akhtar., 2009). A este respecto, la cooperación funcional entre las integrinas y los RTKs es considerada en la actualidad como crucial no solo durante el desarrollo vascular normal y en las enfermedades vasculares (Eliceiri., 2001; Streuli y Akhtar, 2009), sino también en la progresión del tumor y la metástasis (Desgrosellier y Cheresh., 2010; Guo y Giancotti., 2004). En este contexto, estudios *in vitro* han demostrado que durante la adhesión célula-MEC algunos miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) tales como el EGFR/ErbB1 y el ErbB2/Neu el cual hasta el presente no se le conoce ligando, pueden ser parcialmente activados por la asociación con algunas integrinas regulando de esta manera procesos biológicos importantes como la adhesión, proliferación celular, diferenciación, migración, apoptosis y sobrevida en ausencia de sus ligandos (Bill y col., 2004; Moro y col., 1998). Estas funciones son mediadas por rutas de señalización aguas arriba y aguas abajo. Sin embargo, las implicaciones de la interacción entre las integrinas y estos RTKs en particular, requieren de una investigación mas profunda.

En la adhesión célula-MEC al parecer también están involucrados otros receptores no tirosina kinasas (NRTKs) tales como c-Src, la kinasa de adhesión focal (FAK) y paxillina (Geiger y Yamada., 2011; Huveneers y Danen., 2009). c-Src no solo puede regular el crecimiento y la sobrevida celular sino también puede promover la reorganización del citoesqueleto y la disminución de la adhesión célula-MEC y los contactos célula-célula, facilitando la expansión, migración, diferenciación y transcripción (Alper y Bowden., 2005; Guarino., 2010). De manera importante, estudios realizados en células procedentes de

distintos tipos de cáncer de humanos han revelado una sobre-expresión y sobre-activación de los EGFRs y c-Src en ausencia de ligandos (Alper, & Bowden, 2005; Donepudi y Resh., 2008; Guarino, 2010; Marcotte y col., 2009). También existen reportes indicando que, en ausencia de factores de crecimiento, la activación de c-Src y la fosforilación de sus residuos de tirosina 416-419 (Tyr416-419) ocurre debido a su interacción directa con la cola citoplásmica de algunas integrinas y que una vez activada, ella fosforila al EGFR en el residuo Tyr845 y al ErbB2 en el residuo Tyr877 (Bill y col., 2004; Cabodi y col., 2004; Desgrosellier y Cheresch., 2010; Guarino., 2010; Guo y col., 2006; Kim y col., 2005; Marcotte y col., 2009; Moro y col., 2002; Streuli y Akhtar, 2009). De manera interesante, estos patrones de fosforilación en respuesta a la adhesión son diferentes de aquellos producidos u observados durante el enlace del EGF a sus receptores (Bill y col., 2004; Cabodi y col., 2004; Moro y col., 2002). Sin embargo, los mecanismos involucrados en la interacción de c-Src, EGFR y ErbB2, así como sus implicaciones no han sido completamente esclarecidos.

Respecto a los factores de crecimiento, existen reportes recientes indicando que estos pueden afectar indirectamente el funcionamiento de las integrinas a través de la alteración de los contactos célula-célula y modulación de la interacción célula-MEC facilitando por lo tanto la migración e invasión celular. Como se mencionó anteriormente, la sobre-activación de algunos factores de crecimiento o la aberrante activación de algunas tirosinas kinasas podrían conducir a la pérdida de la polaridad apico-basal en células epiteliales así como de los contactos célula-célula. Eventos celulares que han sido

consistentemente reportados durante el proceso de TEM (Baum y col., 2008; Guarino, 2007). No obstante, los aspectos moleculares, mecánicos y celulares por los cuales el EGF y sus receptores ejercen esas acciones permanecen para ser elucidados.

En el contexto de las células endoteliales, reportes recientes indican que la alteración de los contactos célula-célula endotelial o UAs y los cambios en la reorganización de algunas proteínas que conforman el citoesqueleto tales como los microtúbulos (MTs) y los filamentos de actina, pueden ocurrir en respuesta a un daño mecánico, a cambios en las fuerzas biomecánicas generadas por el flujo sanguíneo las cuales suelen ser detectadas por el endotelio (Arciniegas y col., 2007; Arciniegas y Candelle, 2008; Butcher y col., 2009) y/o a las actividades cruzadas de una variedad de factores de crecimiento que incluyen al factor de crecimiento y transformación-beta (TGF- β), al factor de crecimiento de la insulina tipo II (IGFII) y al factor de crecimiento fibroblástico tipo-2 (FGF-2). Los mismos estudios proponen que tales eventos son necesarios en la transición o transformación endotelial; esto es, en el proceso de TEndoM (Arciniegas y col., 2007; Arciniegas y Candelle, 2008).

Estudios recientes relacionados con el EGF y sus receptores indican que ErbB2 puede formar heterodímeros con el EGFR en respuesta a ligandos que incluyen al EGF y al factor de crecimiento y transformación-alfa (TGF- α) y que este heterodímero es esencial durante el desarrollo cardiovascular y la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes) (Camenish y col., 2002; Dreux y col., 2006; Fuller y col., 2008; Mukherjee y col., 2006). De igual manera, la expresión de EGF, TGF- α y

heparin binding-EGF (HB-EGF) así como sus respectivos receptores EGFR y ErbB2 han sido detectadas en las CMLs que conforman los engrosamientos intimaes y región media de lesiones ateroscleróticas, mientras que una muy baja o no expresión de estas moléculas es observada en las células de los vasos sanos (Dreux y col., 2006). El proceso de TEndoM no es solamente reconocido como un fenómeno que ocurre durante la fibrosis cardiaca (Goumans y col., 2008) y la formación de los engrosamientos intimaes observados durante el desarrollo de las grandes arterias (Arciniegas y col., 2007; Carrillo y col., 2010), en la aterosclerosis y re-estenosis (Forte y col., 2010), sino también como un proceso que tiene lugar durante el desarrollo cardiovascular (Mironov y col., 2005), la hipertensión pulmonar (Morrel y col., 2009; Sakao y col., 2011), fibrosis renal (Zeisberg y col., 2008) e intestinal (Rieder y col., 2011), nefropatía diabética (Li y Bertram, 2010), cicatrización hipertrófica (Xi-Qiao y col., 2009), inflamación (Fleener y col., 2011) y durante la progresión del cáncer (Potenta y col., 2008). Sin embargo, no existen estudios relacionados con el papel específico del EGF así como de las posibles rutas de señalización que se generan en el proceso de TEndoM.

En relación al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), estudios recientes realizados en cultivos de células endoteliales han sugerido que durante la pérdida de los contactos célula-célula o UAs como consecuencia de las alteraciones en las fuerzas biomecánicas, se podrían generar una variedad de rutas de señalización las cuales involucrarían a este factor de crecimiento y sus receptores VEGFR-1 y VGFR-2 a través de la formación de complejos con las moléculas que conforman a las UAs y a las integrinas. De manera

interesante, la activación de estos receptores por sus ligandos ha sido asociada con la formación de engrosamientos intimaes (Simons, 2009), así como con el proceso de TEM y la progresión del cáncer (Yang y col., 2006). No obstante, el papel de estas moléculas en la formación de los engrosamientos intimaes aún sigue siendo muy debatido.

Basados en estas evidencias, en este estudio examinamos la presencia, organización y distribución espacial de la integrina β_3 en cultivos primarios de células aórticas embrionarias adheridas a fibronectina (FN) y mantenidas en presencia de Ca^{2+} y ausencia de factores de crecimiento, considerando que la integrina $\alpha_v\beta_3$ es un receptor ampliamente expresado sobre la superficie o cara apical de las células endoteliales el cual enlaza proteínas que están normalmente presentes en plasma, tales como FN, vitronectina, fibrinógeno y el factor von Willebrand (Bombeli y col., 1998; Soldi y col., 1999).

Tomando en cuenta que la activación de c-Src, EGFR y ErbB2 puede ocurrir por asociación con las integrinas (Arias-Salgado y col., 2003; Bill y col., 2004; Cabodi y col., 2004; Desgrosellier y Cheresh, 2010; Ivaska y Heino, 2009; Huveneers y Danen, 2010; Streuli y Akhtar, 2009), en este estudio también investigamos si las formas activadas de esas moléculas estaban presentes en esos cultivos. Debido a que algunos factores de crecimiento pueden indirectamente influir en las funciones de las integrinas interrumpiendo los contactos célula-célula y por tanto modulando la interacción célula-MEC y facilitando la migración celular e invasión, eventos que son en la actualidad considerados como necesarios en la progresión de la TEndoM (Arciniegas y col., 2007; Arciniegas y Candelle, 2008; Bautch, 2011; Carrillo y col., 2010;

Medici y col., 2010), en este estudio también investigamos si EGF y TGF- α así como sus receptores activados participan en el proceso de TEndoM y si ellos están presentes en la pared aórtica de embriones de pollo de 12-14 días de desarrollo (estadíos 38-40) cuando los engrosamientos intimaes están presentes y la transformación o transición endotelial ocurre.

www.bdigital.ula.ve

En base a los antecedentes discutidos en la INTRODUCCIÓN, en el presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

2. OBJETIVO GENERAL.

- Establecer si el EGF, TGF- α y dos de sus receptores (EGFR y ErbB2/neu), así como el VEGF están involucrados en el proceso de transición endotelio-mesénquima. Igualmente, investigar a través de cuál o cuáles mecanismos podrían estar participando estas moléculas en este proceso.

2.1 Objetivos específicos:

2.1.1 Estudios *in vitro*:

- Determinar los efectos del Ca^{2+} sobre la adhesión de las células endoteliales embrionarias a la fibronectina (FN).
- Examinar la presencia, organización y distribución espacial de la integrina β_3 en cultivos primarios de células endoteliales aórticas embrionarias adheridas a FN y mantenidas en presencia de Ca^{2+} e incubadas en ausencia de EGF o TGF- α y luego estimulados con estos factores.
- Establecer si EGF o TGF- α promueven la pérdida de los contactos célula-célula o UAs, la separación de la célula del sustrato y su posterior migración, cuando cultivos primarios de células endoteliales aórticas embrionarias adheridas a FN y mantenidas en presencia de Ca^{2+} fueron incubadas en presencia de estos factores de crecimiento.

- Determinar si ocurren alteraciones en la distribución de β -catenina y p120-catenina, cuando los cultivos fueron mantenidos en presencia de EGF o TGF- α .
- Investigar si las formas activadas de c-Src (Tyr416), p-EGFR (Tyr845) y p-ErbB2 (Tyr877) están presentes en cultivos de células endoteliales cuando los mismos fueron mantenidos en ausencia de EGF o TGF- α y luego incubados con estos factores.
- Confirmar por citometría de flujo la expresión de los receptores EGFR y ErbB2 en sus formas fosforiladas o activadas (Tyr845 y Tyr877, respectivamente) en esos cultivos.
- Examinar los efectos del VEGF en términos de separación, migración y transformación celular, cuando es añadido exógenamente a cultivos primarios de células endoteliales adheridas a FN

2.1.2 Estudios *in vivo*:

- Investigar, por métodos inmunohistoquímicos, si EGF, TGF- α , EGFR y ErbB2 están presentes en la pared aórtica de embriones de pollo en las etapas intermedias del desarrollo, cuando los engrosamientos intimales son evidentes y la transformación o transición endotelial ocurre.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de explantes aórticos

Los huevos fertilizados (*White leghorn*) fueron obtenidos de la Granja Avícola Agropollito C.A. (Paracotos, estado Miranda) e incubados a 37°C y 60% de humedad relativa por un período de 10-11 días (estadios 36-37 de desarrollo) de acuerdo con la clasificación de Hamburger y Hamilton (1992) . Los segmentos de aorta de aproximadamente 8mm² fueron aislados y seccionados en forma longitudinal. Los explantes obtenidos fueron lavados con solución fisiológica de Hank (SFH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ conteniendo 100 µg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA); posteriormente fueron lavados con SFH y dejados en la misma solución por 10 minutos antes de dar inicio a los ensayos.

3.2 Ensayos de adhesión celular

A los fines de determinar los efectos del Calcio (Ca²⁺) en la adhesión de las células endoteliales, placas de Petri de 35mm. de diámetro fueron recubiertas con solución fisiológica de Hank (SFH) conteniendo fibronectina plasmática (FN) (50µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology, CA) e incubados a 37°C por 2 horas en una atmósfera húmeda la cual consistía de una mezcla de CO₂ y de aire (5% y 95%, respectivamente). Estas placas fueron entonces lavadas con SFH y bloqueadas con albúmina bovina (2%) (Sigma-Aldrich) por 1 hora a 37°C y 5% CO₂. Después de esto, los discos fueron lavados con la misma solución e incubados con 300µl de SFH sin Ca²⁺ o SFH suplementado con Ca²⁺ (1-2mM CaCl₂) (Sigma-Aldrich) a 37°C con 5% CO₂ por 1 hora. Los explantes aórticos fueron colocados con la superficie o el lado endotelial en contacto con la

superficie de la placa de Petri permitiéndoles adherirse por un período de 4 horas a 37°C con 5% de CO₂. Al final de este período de tiempo, los explantes adheridos fueron removidos con la ayuda de una aguja fina dejando una monocapa de células endoteliales la cual, en la mayoría de los casos exhibía algunas zonas desprovistas de células o brechas. Las monocapas obtenidas fueron examinadas con un microscopio invertido (IX70-Olympus, Olympus America, Melville, NY). Las imágenes fueron capturadas usando un programa para la obtención y la edición de mismas (Image Pro-Plus Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Cuatro experimentos independientes fueron llevados a cabo, cada uno incluyendo al menos 15 cultivos celulares.

3.3 Cultivos celulares

Estos se iniciaron cuando las monocapas de células endoteliales adheridas a la superficie de las placas recubiertas con FN fueron lavados 5 veces con medio-199 (Sigma-Aldrich) libre de suero conteniendo 100 µg/ml de estreptomycin y 100 U/ml de penicilina (GIBCO), Hepes (GIBCO) pH: 7,4 (referido como MLS) e incubados con este mismo medio por 2-3 horas a 37°C y 5% de CO₂. Las imágenes fueron capturadas usando el programa Image ProPlus.

3.4 Ensayos de estimulación con EGF en cultivos primarios de células endoteliales.

Para determinar si el EGF o TGF-α estimulan la separación de las células endoteliales y la migración, el medio de algunas monocapas que habían sido mantenidas en este medio durante 2-3 horas fue cambiado a medio suplementado con EGF (100ng/ml) o con TGF-α (10ng/ml) (ambos, proteínas recombinantes de humano. RD Systems, MN) y suero de pollo (SP) a una

concentración muy baja (0.1%) (GIBCO) o medio suplementado con SP al 0,1% (Sigma-Aldrich), usando ácido acético 10mM como vehículo (solvente con el cual se reconstituyó el EGF) e incubadas en una atmósfera húmeda que consistía de una mezcla de CO₂ y de aire (5% y 95%, respectivamente) por un periodo adicional de 6-8 horas. Durante este período, las imágenes fueron capturadas cada 2 horas usando un microscopio invertido Olympus IX-70 y el programa Image ProPlus. Cada experimento incluyó al menos 10 cultivos celulares.

3.5 Inmunofluorescencia.

Las monocapas fueron procesadas para inmunofluorescencia procediendo de la siguiente manera: fueron fijadas con formaldehído 2% en PBS durante 20 minutos y permeabilizadas en metanol 50% y 100%,(en frío) luego lavadas 3 veces con PBS y bloqueadas con PBS extra (BSA 2% + NaCl 0.88%) por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavadas, las monocapas fueron incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes. Estos fueron obtenidos de diferentes fuentes y aparecen resumidos en la Tabla 1. Cumplido este tiempo, fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas por 30 minutos con un anticuerpo secundario conjugado a FITC (fluorescein-1-isothiocyanate) o conjugado a TRITC (tetramethylrhodamine-isothiocyanate (DAKO) (ambos diluidos 1/50) y producidos en ratón y conejo, respectivamente. Finalizado este período, fueron lavadas 3 veces con PBS y cubiertas con medio montante Immu-mount (Shandon, Pittsburg PA, USA). Los controles negativos fueron producidos omitiendo el anticuerpo primario y colocando en su lugar PBS. Las imágenes de inmunofluorescencia fueron capturadas con un

microscopio invertido confocal (rayo láser) (Eclipse TE-300 Nikon) (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) el cual estaba equipado con un objetivo Nikon Plan-Apo, 60x, 1.2 wi acoplado a una unidad láser de Argón con aire frío (488nm). Esta unidad estaba controlada por interfase D-Eclipse C1. Otras imágenes de inmunofluorescencia fueron capturadas con un microscopio invertido Olympus IX81 (Fluo-View) configuración láser de barrido. La intensidad de la inmunofluorescencia fue medida haciendo uso de programa FV10.ASW versión 02.01.01.04 (Olympus).

Para la detección de α -músculo liso actina y el factor von Willebrand (vWf) por doble inmunofluorescencia, las monocapas fueron incubadas en forma secuenciada con los anticuerpos primarios correspondientes que aparecen reportados en la Tabla .

3.6 Inmunoperoxidasa in vitro

La detección de EGFR (Tyr845) y ErbB2 (Tyr877) se realizó empleando la técnica de inmunoperoxidasa. Para ello, las monocapas de células endoteliales fueron lavadas con SFH y fijados con 2% formaldehído más 1% de sacarosa durante 20 minutos y lavados 3 veces con PBS pH 7,4 (5 minutos para cada lavado). Posteriormente, la actividad enzimática de la peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% (DAKO) durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS pH 7,4 (5 minutos c/u) seguido de un bloqueo con PBS conteniendo 10% BSA (Sigma-Aldrich) durante una hora. Seguidamente, las monocapas fueron lavadas con PBS pH 7,4 e incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes. Estos fueron obtenidos de diferentes fuentes y también

aparecen resumidos en la Tabla. Al día siguiente y una vez alcanzada la temperatura ambiente, las monocapas fueron lavados 3 veces con PBS pH 7,4 por 15 minutos e incubadas con el anticuerpo secundario o biotinilado (Dako Cytomation) durante 15 minutos. Al final de este período, nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS y se les incubó con el complejo estreptavidina-HRP (Dako Cytomation) por un lapso de 15 minutos para finalmente ser lavados como en las oportunidades anteriores. El revelado se realizó por 1 minuto utilizando una solución sustrato-cromógeno (H_2O_2 -cromógeno) (Dako Cytomation). Finalmente, las monocapas fueron contrastadas con Hematoxilina de Mayer colocándoseles luego una gota de medio montante Aqua permTM (Santa Cruz). Los controles negativos fueron producidos omitiendo el anticuerpo primario y colocando en su lugar PBS. Los cortes fueron observados y analizados en un microscopio invertido Olympus IX-70 con una magnificación de 20X y 40X. Las imágenes obtenidas fueron capturadas utilizando el programa Image-ProPlus.

3.7 Análisis por citometría de flujo de las formas fosforiladas de EGFR (Tyr 845) y ErbB2 (Tyr877) en células endoteliales embrionarias.

La expresión de las formas fosforiladas o activadas de EGFR (Tyr845) y ErbB2 (Tyr877) en monocapas de células endoteliales que fueron mantenidas en MLS por 2-3 horas y monocapas cuyo medio de cultivo fue cambiado a medio suplementado con rhEGF (100ng/ml) o rhTGF- α (R&D Systems) y una baja concentración de SP (0,1%) (Sigma-Aldrich) e incubadas por un período adicional de 6-8 horas, fue analizada por citometría de flujo. Para esta

evaluación las células fueron lavadas en solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) pH 7,4 (GIBCO) y tratadas con tripsina 1X, una vez que las células se despegaron del sustrato, estas fueron recolectadas en tubos eppendorf de 1,5 ml y fijadas con cytofix (Pharmigen, San Diego, CA) por 20 minutos a 4°C. Luego fueron centrifugadas a 1200 rpm por 7 minutos; el "pellet" obtenido fue resuspendido en buffer Perm wash (Pharmigen), nuevamente fue centrifugado a 1000 rpm por 7 minutos y el "pellet" fue resuspendido en PBS 0,1% BSA conteniendo los anticuerpos primarios correspondientes (ver Tabla 1) por 20 minutos a 4°C. A continuación se realizaron 2 lavados consecutivos y las células fueron incubadas por 20 minutos a 4°C con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) conjugado a FITC; seguidamente se llevó a cabo un lavado resuspendiendo las células en 200 µl PBS/ 0.1%BSA en frío para ser analizadas posteriormente. Para la obtención de los controles negativos correspondientes, las células fueron incubadas con IgG de conejo en vez del anticuerpo primario. La recolección y el análisis de los datos obtenidos en relación a las intensidades de la fluorescencia fueron realizados usando un equipo FACScalibur (Becton-Dickinson, San José, CA). Diez mil eventos fueron adquiridos (excluyendo los restos de células) y analizados usando el programa the CELLQuest.

3.8 Obtención de segmentos de aortas para cortes en parafina.

Las aortas fueron aisladas de embriones de pollo (*White leghorn*) de 12-14 días de desarrollo (estadios 38-40) según clasificación de Hamburger y Hamilton (1992) e incubados a 37°C y 60% de humedad, procedentes de la granja Avícola Agropollito CA. Ubicada en Paracotos estado Miranda.

Las aortas fueron extraídas utilizando un equipo de microcirugía y trabajando bajo una lupa estereoscópica (Olympus). La disección de las aortas se realizó en solución fisiológica de Hank, (SFH) pH 7,2. Luego se lavaron con solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) pH 7,4 (GIBCO) y se fijaron en formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas, las muestras fueron deshidratadas utilizando concentraciones ascendentes de etanol, transferidas a una mezcla de xilol-parafina y embebidas en parafina. Cortes de tejido de 4 a 5 μm de espesor fueron colocados en portaobjetos silanizados (Dako Cytomation) y desparafinados con xilol puro por un lapso de 30-60 minutos e hidratados con concentraciones decrecientes de etanol y agua destilada, para luego ser utilizados en la detección de EGF, EGFR y ErbB2 por medio de la técnica de inmunoperoxidasa. Un total de seis aortas por cada estadio, obtenidas de tres lotes diferentes de embriones, fueron procesadas.

3.9 Inmunoperoxidasa en cortes desparafinados.

Para investigar la presencia de EGF, TGF- α , EGFR y ErbB2 así como su distribución espacial en secciones transversales, se aplicó la técnica de avidina-biotina peroxidasa haciendo uso del Kit comercial (Dako Cytomation LSAB® + System-HRP, peroxidada de rábano) y siguiendo lo descrito por Arciniegas y col. (2000), como se detalla a continuación: Los cortes fueron lavados con PBS pH 7,4 durante 30 minutos. Para bloquear la peroxidada endógena, los cortes fueron incubados con Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 3% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBS pH 7,4 se llevó a cabo el bloqueo de inespecificidades, con 2% de albúmina de

suero bovino (BSA) por una hora. Los cortes fueron incubados toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: un anticuerpo policlonal diseñado para neutralizar los efectos del EGF, (RD & Systems) a la concentración de 20µg/ml y los anticuerpos policlonales producidos contra la región carboxi-terminal del EGFR y ErbB2 (Santa Cruz Biotechnology CA), ambos preparados en conejo. Después de varios lavados en PBS, un anticuerpo secundario Biotinilado (Dako Cytomation) fue aplicado por 15 minutos a temperatura ambiente, seguido por el complejo estreptavidina-HRP (Dako Cytomation), también por 15 minutos. El revelado se realizó por 1 minuto utilizando una solución sustrato-cromógeno (H₂O₂-cromógeno) (Dako Cytomation). Finalmente las láminas fueron contrastadas con Hematoxilina de Mayer y se les colocó una gota de medio montante (Aqua permTM). Los cortes fueron observados y analizados en un microscopio invertido Olympus IX-70 con una magnificación de 20X y 40X. Las imágenes obtenidas fueron capturadas utilizando el programa Image-Proplus (Imation, Image-Proplus, Media Cybernetics).

Los controles negativos fueron realizados utilizando PBS en lugar del anticuerpo primario.

3.8 Ensayos de estimulación con VEGF en cultivos primarios de células endoteliales.

Estos ensayos fueron llevados a cabo cuando las monocapas de células endoteliales embrionarias adheridas a FN, fueron lavadas 2 veces con medio e incubadas por un período de 10-12 horas con medio suplementado con rhVEGF (10-20ng/ml) (R&D Systems) durante 10-12 horas y muy baja concentración de SP (0,1%) o medio suplementado con SP (0,1%) y ácido

acético 10mM, solvente con el cual se reconstituyó el VEGF (este medio será referido como vehículo). Las imágenes fueron capturadas usando un microscopio invertido Olympus IX70 y el programa Image ProPlus. Cada experimento incluyó al menos 10 cultivos.

www.bdigital.ula.ve

Tabla: Resumen de anticuerpos primarios utilizados en este estudio.

Anticuerpo primario / Clon	Fuente	Antígeno reconocido	Dilución	Casa Comercial
anti-vWf	Conejo	vWf	1/50 (IF)	Dako
anti-alfa-músculo liso actina /1A4	Ratón	Alfa-músculo liso actina	1/500 (IF) 1/1000 (IP)	Sigma-Aldrich
anti-p120-catenina / 6H11	Ratón	p120-catenina	1/20 (IF)	Santa Cruz Biotechnology
anti- β -catenina / 6F9	Ratón	β -catenina	1/20 (IF)	Santa Cruz Biotechnology
anti- Integrina β_3 / GPIIIa, CD61	Ratón	Integrina β_3	1/20 (IF)	Millipore Chemicon
anti- Integrina β_1 / 9D11	Ratón	Integrina β_1	1/20 (IF)	Millipore Chemicon
anti- Tubulina / DM1A	Ratón	Tubulina	1/40 (IF)	Santa Cruz Biotechnology
anti- c-Src /	Ratón	c-Src	1/50	Santa Cruz

9A6		Tyr 416-422	(IF)	Biotechnology
anti- Phospho- FAK (tyr397)	Conejo	Phospho- FAK Tyr397	1/50 (IF)	Sigma-Aldrich
anti- Phospho EGFR (Tyr845)	Conejo	Phospho EGFR Tyr845	1/20 (IP, CF)	Santa Cruz Biotechnology
anti- Phospho ErbB2 (Tyr877)	Conejo	Phospho ErbB2 Tyr877	1/20 (IP, CF)	Santa Cruz Biotechnology
anti-humano EGF	Cabra	EGF	1/20 (IP)	R&D Systems
anti- humano TGF- α	Cabra	TGF- α	1/20 (IP)	R&D Systems
anti- EGFR	Conejo	EGFR (c- terminal)	1/20 (IP)	Santa Cruz Biotechnology
anti- Neu	Conejo	Neu (c- terminal)	1/20 (IP)	Santa Cruz Biotechnology

IF: inmunofluorescencia

IP: inmunoperoxidasa

CF: citometría de flujo

4. RESULTADOS.

4.1 Efectos del Ca^{2+} sobre la adhesión de las células endoteliales.

A los fines de determinar el efecto del Ca^{2+} sobre la adhesión de las células endoteliales a la FN, explantes aórticos de 10 y 11 días de desarrollo (estadios 36 y 37) fueron colocados con la superficie o cara apical endotelial en contacto con las placas cubiertas con FN y conteniendo SFH o SFH suplementada con 2mM Ca^{2+} e incubadas por 5 horas.

Una vez que los explantes fueron removidos, monocapas de células endoteliales que fueron alteradas mecánicamente durante la remoción del explante y exhibiendo zonas desprovistas de células o brechas, fueron encontradas adheridas a la superficie de las placas cubiertas con FN que contenían SFH suplementada con Ca^{2+} (Fig. 1b), pero no en aquellas que contenían solamente SFH (Fig. 1a).

Para enfatizar el posible papel del Ca^{2+} en la adhesión endotelial, explantes aórticos fueron incubados en placas cubiertas con FN conteniendo medio 199 libre de suero (MLS) o MLS más 2mM EGTA para contrarrestar los efectos del Ca^{2+} extracelular. Al igual que otros medios de cultivo, el medio-199 es conocido por su contenido de Ca^{2+} y su relativamente baja concentración de Mg^{2+} .

Cuando los explantes fueron removidos, monocapas de células endoteliales exhibiendo zonas desprovistas de células o brechas fueron encontradas adheridas a la superficie de las placas cubiertas con FN que contenían MLS

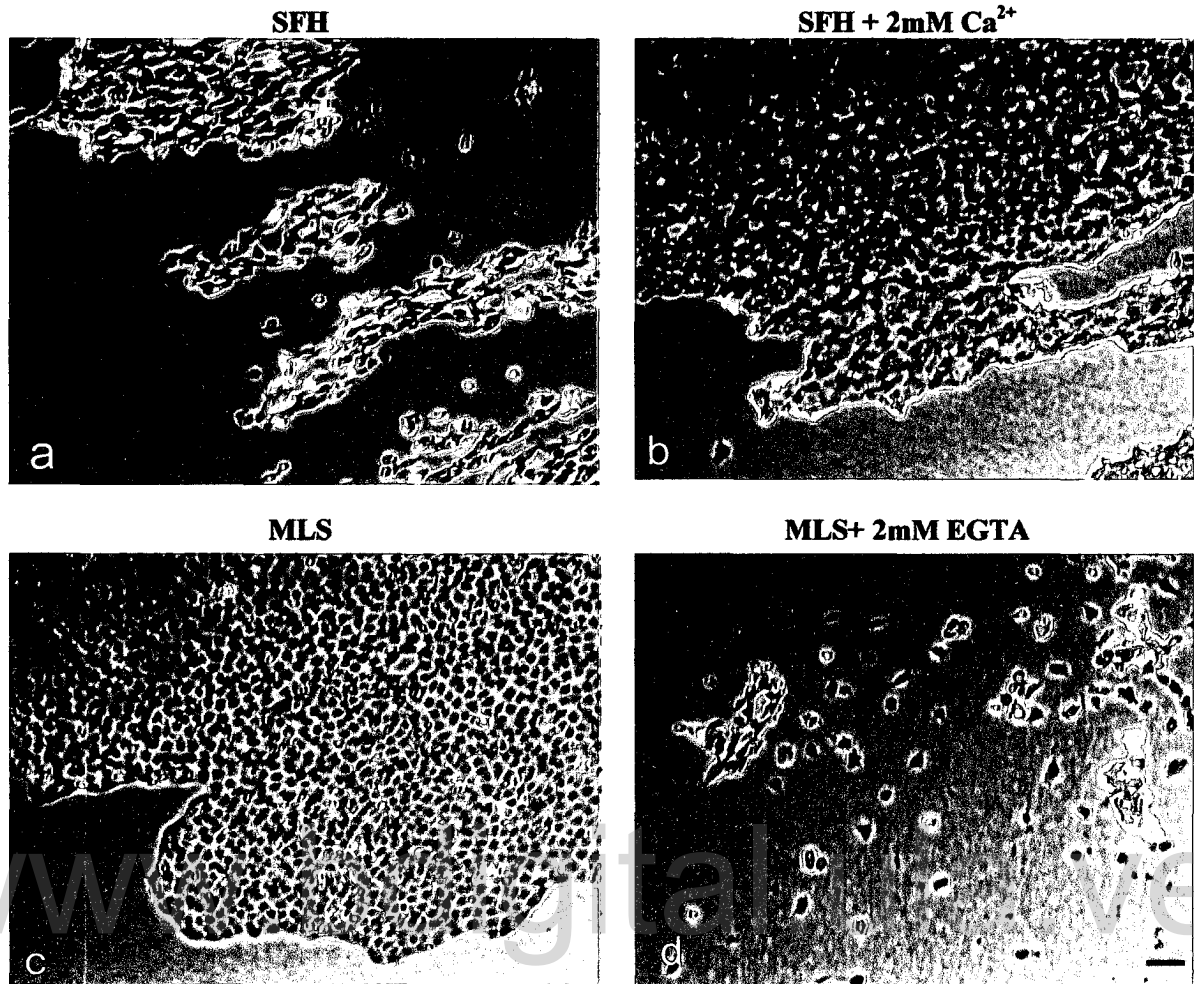


Figura 1. Imágenes de microscopía de contraste de fases, cuando los explantes aórticos fueron removidos luego de haber sido incubados por 5 horas en placas de Petri cubiertas con FN conteniendo a) SFH sola, b) SFH suplementada con 2mM Ca²⁺, c) MLS solo y d) MLS suplementado con 2mM EGTA. Note que sólo cuando los explantes fueron incubados con SFH suplementado con Ca²⁺ (b) y con MLS (c) fue posible encontrar monocapas de células endoteliales adheridas a la superficie de la placa luego de haber removido el explante. Barra: 150µm.

(Fig. 1c), pero no en aquellas placas que contenían MLS y EGTA (Fig. 1d). Cuando las monocapas de células endoteliales fueron mantenidas en presencia de MLS por 2-3 horas y luego examinadas, observamos que las células adoptaron la apariencia de un empedrado (cobblestone). Bajo esta condición de cultivo no fue posible observar células migrando a partir de las brechas de la monocapa, ni tampoco células extendiéndose, separándose unas de otras ni del sustrato (detachment), ni migrando a partir de los bordes hacia los espacios libres (Figs 2,a,b). No obstante, cuando, después de este intervalo de tiempo, el medio de algunos cultivos fue cambiado a MLS conteniendo EGF o TGF- α y baja concentración de suero de pollo (SP) y mantenidos por un período adicional de 6-8 horas, las células endoteliales localizadas a lo largo de las brechas parecían moverse dentro del área correspondiente a estas (re-endotelialización), mientras que las células localizadas en los bordes de la monocapa parecían perder sus contactos célula-célula o UAs y por consiguiente su apariencia de empedrado, separándose del sustrato y migrando hacia las áreas libres de células (Figs. 2c,d). Inmunofluorescencia analizada por microscopía confocal determinó que en la condición de MLS en la cual las células exhibían una apariencia de empedrado y donde no se observan células separándose unas de otras ni del sustrato, ni migrando, β -catenina y p120-catenina, proteínas consideradas como reguladoras de la función de VE-cadherina, fueron localizadas en los contactos célula-célula o UAs con las MTs emanando del llamado centro organizador de los microtúbulos (MTOC), algunos organizados radialmente mientras que otros aparecían orientados perpendicularmente a los bordes de la célula sugiriendo una posible interacción con las UAs (Akhmanova y col., 2009) (Figs. 3a-c). Mientras que en

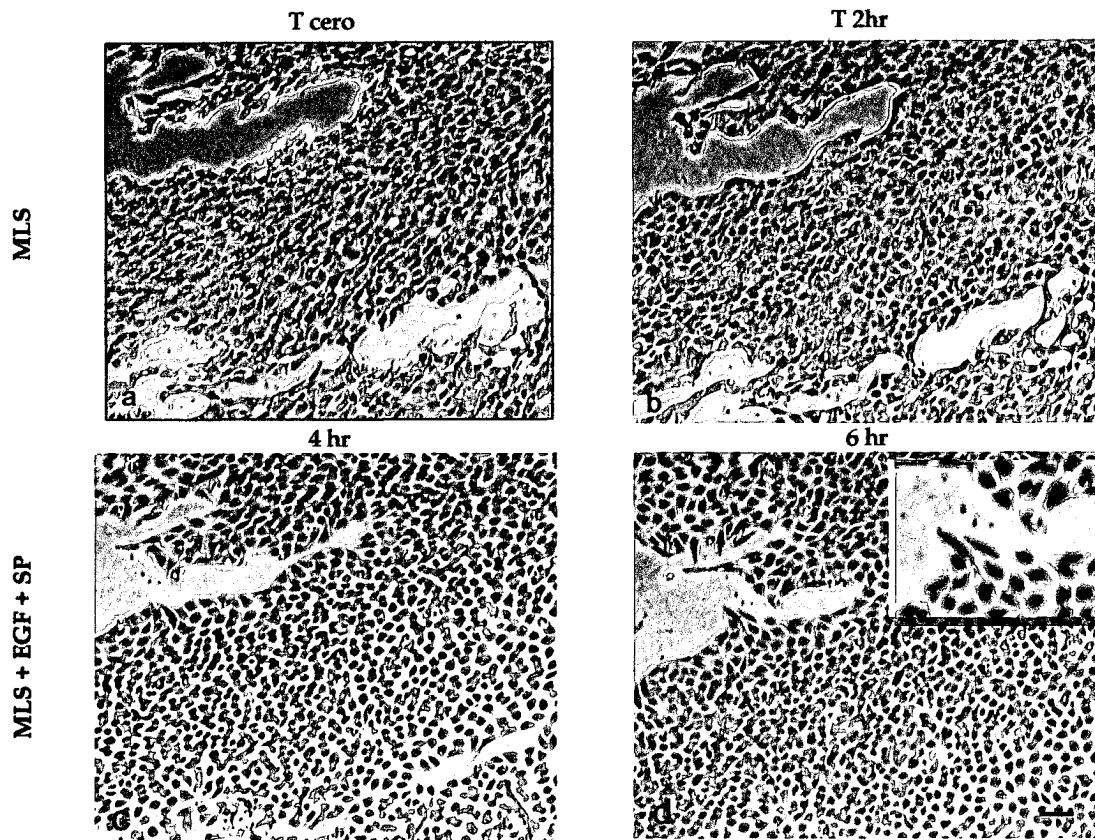


Figura 2. Representa una secuencia de imágenes de microscopía de contraste de fases de una monocapa de células endoteliales adherida a la superficie de la placa de Petri cubierta con FN y la cual fue mantenida en MLS y luego cambiada a MLS suplementada con EGF (100ng/ml) y suero de pollo (SP) a muy baja concentración (0,1%). **a)** Tiempo cero: muestra una monocapa de células endoteliales exhibiendo zonas desprovistas de células o brechas luego de haber removido el explante. **b)** Tiempo 2 horas: Las células han adoptado una apariencia de empedrado donde no se observan células separándose ni migrando a partir de los bordes. **c)** Tiempo 4 horas: cuando el medio del mismo cultivo fue cambiado y mantenido por 2 horas adicionales (total 4 horas) se observa una desorganización de la monocapa donde las células aparecen separándose, despegándose de la superficie y migrando. **d)** Tiempo 6 horas: Las células del borde de la monocapa se observan extendiendo lamelipodios hacia las áreas libres. Detalle de la figura “d” mostrando las células migrando. Barra: 150µm. Barra inserto: 40µm.

la condición de EGF o TGF- α y baja concentración de SP cuando las células aparecen extendiéndose, separándose unas de otras y del sustrato y migrando, la distribución de β -catenina y p120-catenina se observó interrumpida (disrupted) en las uniones célula-célula o UAs y la organización de los MTs estaba modificada (Figs. 3d-f). Específicamente, los MTs fueron observados algunos orientados paralelos al eje principal de la célula y al MTOC y otros dirigidos hacia los bordes de las mismas (Fig. 3f). De manera interesante, β -catenina también fue detectada en el núcleo de algunas células que estaban separándose unas de otras y del sustrato y migrando (Fig. 3d). Esta localización indica que la translocación de β -catenina desde la membrana plasmática hasta el núcleo puede ocurrir también en respuesta a EGF o TGF- α y al SP.

Estas observaciones indican que el Ca^{2+} en ausencia de factores de crecimiento, podría representar un requerimiento importante para promover la adhesión y la eventual organización en monocapas de las células endoteliales embrionarias obtenidas de los explantes; mientras que la adición de EGF o TGF- α y SP podría conducir a la pérdida de las UAs, separación del sustrato y migración celular, en otras palabras a la pérdida de la polaridad endotelial.

Doble inmunofluorescencia reveló que algunas de las células que se habían separado y migrado hacia las áreas libres, exhibían inmunoreactividad para vWf y alfa-músculo liso actina (α -ML actina) (Fig. 4). La presencia de esas células en particular confirmó que algunas células endoteliales se habían transformado en células mesenquimáticas expresando α -ML actina cuando fueron estimuladas con EGF.

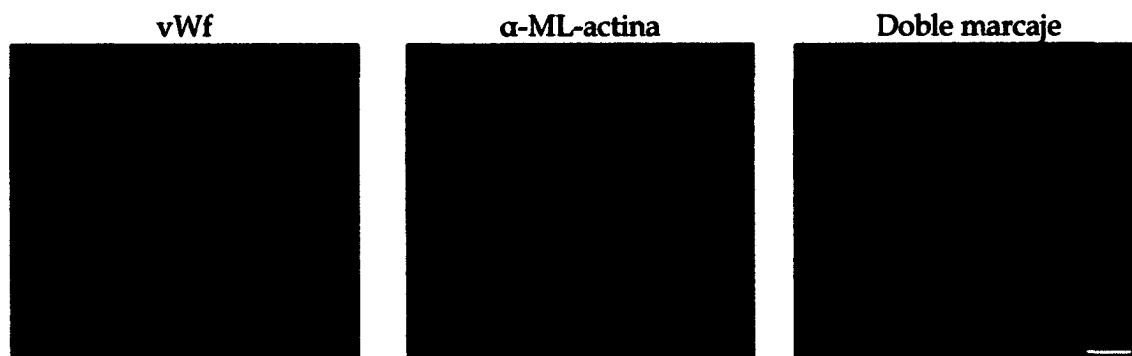


Figura 4. Imágenes de inmunofluorescencia obtenidas con un microscopio confocal del vWf y de α -ML-actina en una monocapa de células endoteliales adheridas a FN y mantenidas durante 8 horas en presencia de EGF (100ng/ml). Se observa una fuerte inmunoreactividad para vWf (rojo) con un patrón granular típico de células endoteliales y otra para α -ML-actina (verde) delineando los márgenes de las células. Doble inmunofluorescencia del mismo campo muestra algunas células exhibiendo doble inmunoreactividad para ambas proteínas Barra: 20 μ m.

4.2 La adhesión de las células endoteliales a la FN en presencia de Ca^{2+} y ausencia de suero o factores de crecimiento es mediada por la integrina β_3 y la adición de EGF o TGF- α produce cambios en la distribución y organización de esta integrina.

Debido a que la adhesión célula-MEC en presencia de cationes divalentes tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} es actualmente correlacionada con la activación, organización y distribución espacial de algunas integrinas en células normales y tumorales (Cierniewska-Cieslak y col., 2002; Cluzel y col., 2005; Leitinger y col., 2000; Luo y Springer, 2006) y debido a que la integrina $\alpha_v\beta_3$ es un receptor ampliamente expresado sobre la superficie apical de las células endoteliales que enlaza proteínas que están presentes normalmente en el plasma, tales como FN, vitronectina, fibrinógeno y vWf (Bombeli y col., 1998; Soldi y col., 1999), en este estudio examinamos por inmunofluorescencia la presencia, organización y distribución de la integrina β_3 en monocapas de células endoteliales que fueron encontradas adheridas a FN después de haber removido los explantes e incubadas con MLS por 2-3 horas, así como también en aquellas monocapas cuyo medio fue cambiado a medio conteniendo EGF o TGF- α y baja concentración de SP y mantenidas por un período adicional de 6-8 horas. El examen de las monocapas mantenidas en MLS reveló que la integrina β_3 , además de estar localizada en la superficie apical endotelial, también aparecía distribuída delineando los márgenes de las células que habían adoptado una apariencia de empedrado (Fig. 5a). En aquellas monocapas cuyo medio fue cambiado a medio conteniendo EGF o TGF- α y

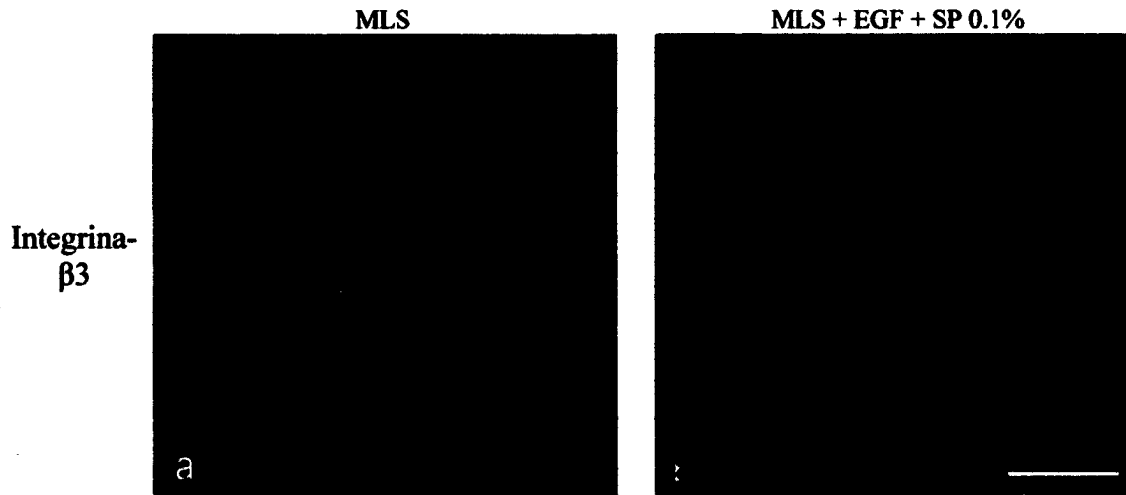


Figura 5. a) Superposición de imágenes de transmisión y fluorescencia obtenidas con un microscopio confocal de la integrina β_3 en una monocapa de células endoteliales adheridas a FN después de haber sido mantenida en MLS durante 2 horas. Integrina β_3 es observada en la superficie apical y delineando los márgenes de muchas células que presentan una apariencia de empedrado. **b)** Imagen de fluorescencia de integrina β_3 en una monocapa cuyo medio fue cambiado a MLS conteniendo EGF (100ng/ml y SP (0,1%). Integrina β_3 se observa delineando algunas de las células y organizada en un patrón lineal y punteado en el borde de aquellas que se encuentran migrando. Barra: 50 μ m.

bajo SP, la localización y distribución de integrina β_3 aparecía alterada (Fig. 5b). Específicamente, este receptor fue hallado delineando los márgenes de algunas células y organizado en trazas lineales con un patrón punteado típico de las adhesiones focales en los bordes de las células que estaban extendiéndose, separándose, despegándose del sustrato y migrando (Fig. 5b).

Estas observaciones sugieren que la adhesión a la FN y eventual organización de las células endoteliales embrionarias en presencia de Ca^{2+} y ausencia de suero o factores de crecimiento puede ser mediada por integrina β_3 y que la presencia de EGF o TGF- α y SP podría producir cambios en la distribución espacial y organización de este receptor.

4.3 Inmunolocalización de integrina β_1 y p-FAK *in vitro*

Las adhesiones focales son consideradas no solo como enlaces estructurales y dinámicos entre la MEC y el citoesqueleto de actina que regulan la forma de las células, su extensión, y migración, sino también como sitios para la transducción de señales a través de integrinas tales como integrina β_1 y β_3 y proteínas adaptadoras como la FAK y la paxilina las cuales están presentes en esos sitios (Geiger y Yamada, 2011; Gu y col., 2011; Mitra y col., 2005). Por lo tanto en este estudio examinamos la presencia y organización y distribución de integrina β_1 y FAK cuando el medio de cultivo fue cambiado a medio conteniendo EGF y baja concentración de SP.

La Inmunolocalización con anti-integrina β_1 y anti-fosfo FAK (anti-p FAK) (Tyr397) reveló que ambas proteínas aparecían delineando el margen de algunas células y organizadas en trazas lineales típicas de adhesiones focales

en las células que estaban separándose, despegándose y migrando (Figs. 6 a,b).

4.4 Activación parcial de EGFR y ErbB2/Neu mediada por integrina β_3 es aumentada por la adición de EGF o TGF- α y baja concentración de suero de pollo

Un número importante de evidencias sugieren que la adhesión a la MEC mediada por integrinas puede promover el reclutamiento y la activación parcial de ciertos RTKs incluyendo EGFR y ErbB2/Neu en ausencia de suero o factores de crecimiento (Desgrosellier y Cheresch, 2010; Ivaska y Heino, 2010; Streuli y Akhtar, 2009; Yamada y Even-Ram, 2002); por lo tanto, en este estudio también investigamos si EGFR y ErbB2 en sus formas activadas estaban presentes en monocapas de células endoteliales embrionarias que estaban adheridas a placas cubiertas con FN y que fueron incubadas en MLS por 2-3 horas para luego ser cambiadas a MLS suplementado con EGF o TGF- α y SP y mantenidas por un período adicional de 6-8 horas.

Bajo esas condiciones la expresión de ambos receptores activados fue investigada mediante la técnica de inmunoperoxidasa usando anti-fosfo EGFR (p-EGFR) (Tyr845) y anti-fosfo ErbB2 (p-ErbB2) (Tyr877).

En la condición de MLS, una inmunoreactividad para p-EGFR y p-ErbB2 fue localizada principalmente en los sitios de contactos célula-célula o UAs. Adicionalmente, en algunas células de las monocapas que habían adoptado una apariencia de empedrado una inmunoreactividad perinuclear y nuclear para ambos RTKs sugestiva de activación, internalización y translocación

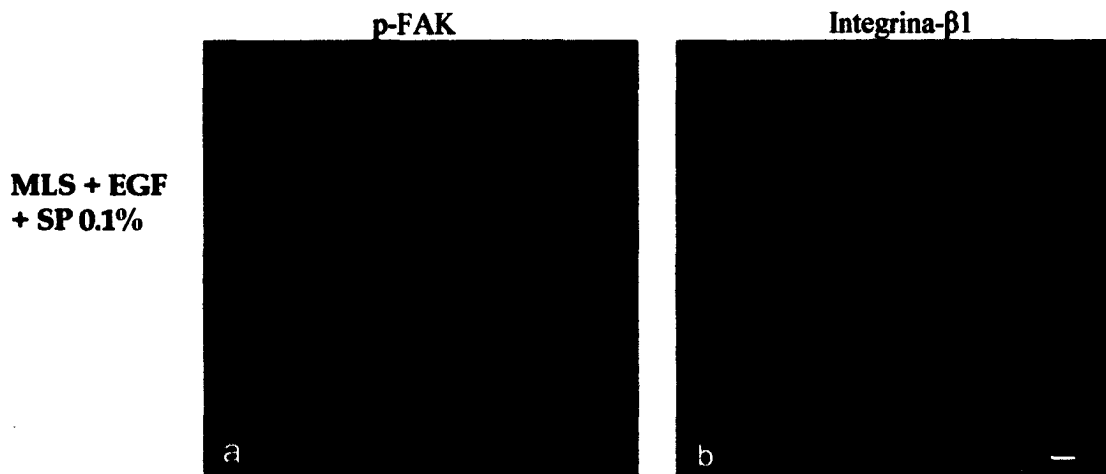


Figura 6. Imágenes de inmunofluorescencia obtenidas con un microscopio confocal de p-FAK (Tyr397) e integrina β_1 en monocapas de células endoteliales adheridas a FN y mantenidas durante 8 horas en MLS suplementado con EGF (100ng/ml y SP (0,1%). Tanto p-FAK (Tyr397) (a) como Integrina β_1 (b) aparecen delineando el margen de algunas células y organizados en un patrón típico de adhesiones focales en el borde de la células que están migrando. a) Barra: 10 μ m b) Barra: 5 μ m.

nuclear también fue observada (Figs. 7a, b). De manera notable, en presencia de EGF o TGF- α y SP, una fuerte inmunoreactividad perinuclear y nuclear para p-EGFR fue detectada en muchas células de la monocapa, así como también en muchas de las que aparecían separándose, despegándose del sustrato y migrando; mientras que en los sitios de contacto célula-célula o UAs esta inmunoreactividad aparecía interrumpida (Fig. 7c). Para p-ErbB2, la inmunoreactividad fue menos intensa comparada con la observada para p-EGFR. En esta condición la inmunoreactividad para p-ErbB2 en las UAs también aparecía interrumpida (Fig. 7d). Ninguna inmunoreactividad fue observada cuando el anticuerpo primario fue omitido.

La expresión de p-EGFR (Tyr845) y p-ErbB2 (Tyr877) en algunos cultivos fue confirmada por citometría de flujo (Fig. 8). Esta técnica reveló una expresión elevada de p-EGFR y p-ErbB2 en presencia de EGF o TGF- α y baja concentración de SP, en contraste con aquella detectada en MLS.

Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren que la fosforilación parcial o activación del EGFR y ErbB2 mediada por integrina β_3 puede ser aumentada por la adición de EGF o TGF- α y baja concentración de SP.

4.5 Inmunolocalización *in vitro* de p-c-Src (Tyr416)

Estudios recientes han indicado que después de la adhesión de las células a la MEC la cola citoplásmica de la integrina β_3 puede interactuar directamente con c-Src promoviendo su activación y que éste una vez activado es capaz de fosforilar a ErbB2 en su residuo Tyr877 (Marcotte y col., 2009); por lo tanto, en este estudio también investigamos si la forma activada de c-Src estaba

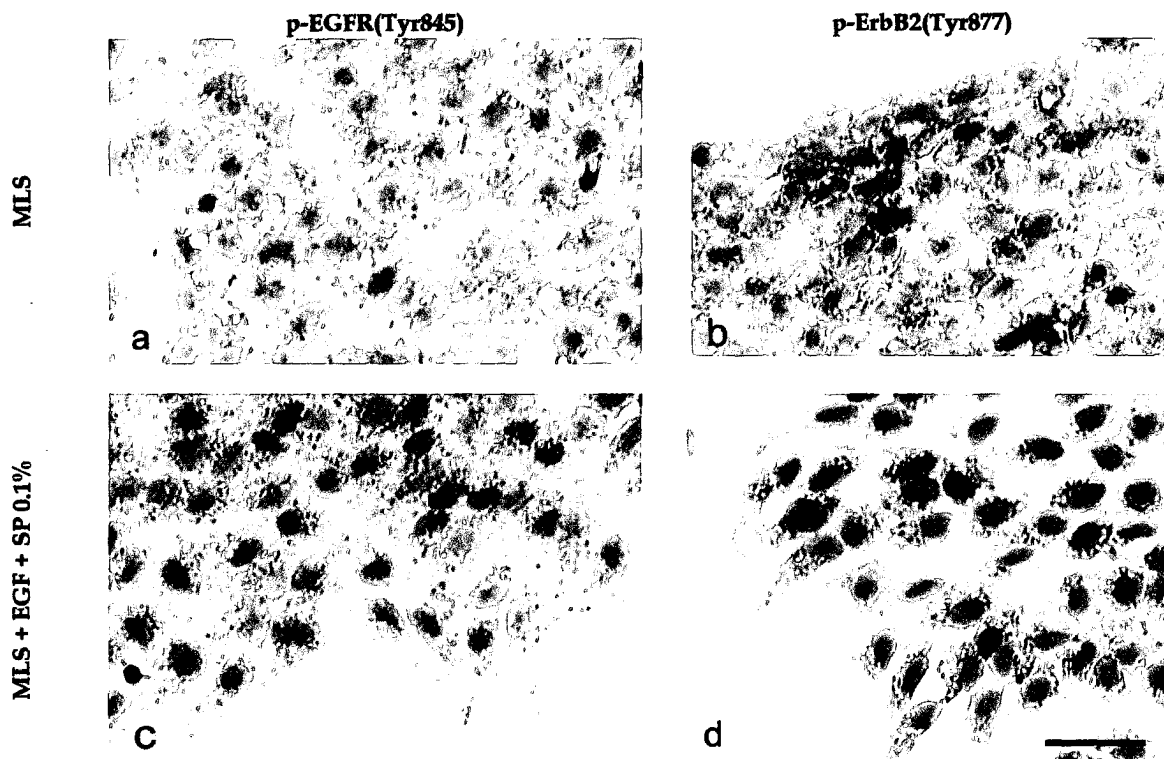


Figura 7. a,b) Inmunolocalización de p-EGFR (Tyr845) y p-ErbB2 (Tyr877) en monocapas de células endoteliales adheridas a FN después de 2 horas en presencia de MLS. Un inmunomarcaje para ambos receptores es detectado en los sitios de contacto célula-célula o UAs, así como en el núcleo y en la región perinuclear de algunas células de la monocapa. **c, d)** Inmunolocalización de p-EGFR (Tyr845) y p-ErbB2 (Tyr877) en monocapas cuyos medios fueron cambiados a MLS conteniendo EGF (100ng/ml) y SP (0,1%) y mantenidos por 4 horas adicionales (total 6 horas). Un fuerte inmunomarcaje nuclear y perinuclear para p-EGFR (Tyr845) es observado en la mayoría de las células que estaban separándose, despegándose y migrando, mientras que en las UAs el inmunomarcaje aparece interrumpido. Un inmunomarcaje menos intenso fue observado para p-ErbB2 (Tyr877) en el núcleo de muchas células. Note que el marcate en las UAs también aparece interrumpido. Barra: 50 μ m

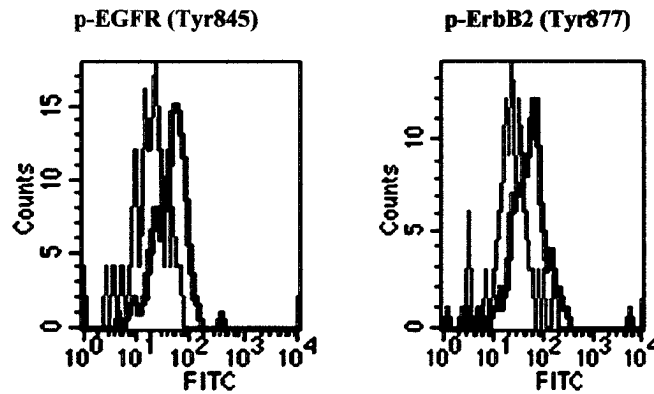


Figura 8. Análisis por citometría de flujo de la expresión de p-EGFR (Tyr845) y p-ErbB2 (Tyr877) en células endoteliales que fueron mantenidas en MLS durante 2 horas y en células cuyo medio fue cambiado a MLS suplementado con EGF (100ng/ml) y SP (0,1%) y cultivados por 4 horas adicionales (total 6 horas). Como controles negativos se emplearon los isotipos correspondientes. Los histogramas muestran la expresión de p-EGFR (Tyr845) y de p-ErbB2 (Tyr877) en células endoteliales tratadas con MLS (histogramas grises) o EGF (histogramas blancos). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes, los cuales fueron muy similares.

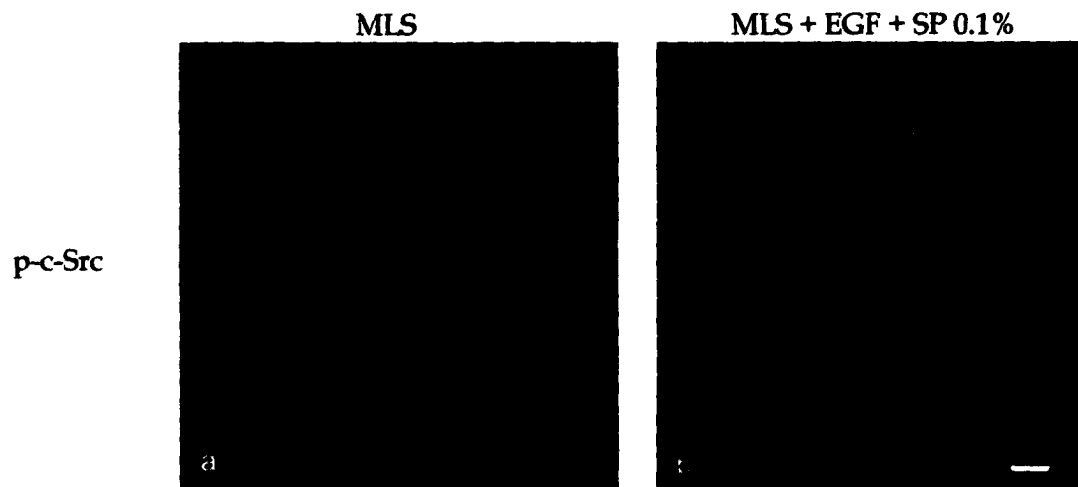


Figura 9. a) Imagen de confocal de p-c-Src (Tyr416) en una monocapa de células endoteliales adheridas a FN después de 2 horas cultivadas en presencia de MLS. Observe que p-c-Src esta presente en los contactos célula-célula o UAs. **b)** Imagen confocal de p-c-Src en una monocapa cuyo medio fue cambiado a MLS suplementado con EGF y SP. p-c-Src aparece alineado con los microtúbulos y también organizado exhibiendo un patrón lineal y punteado en los lamelipodios. Note que este NRTK es también detectado en el núcleo de algunas células. Barra: 15 μ m.

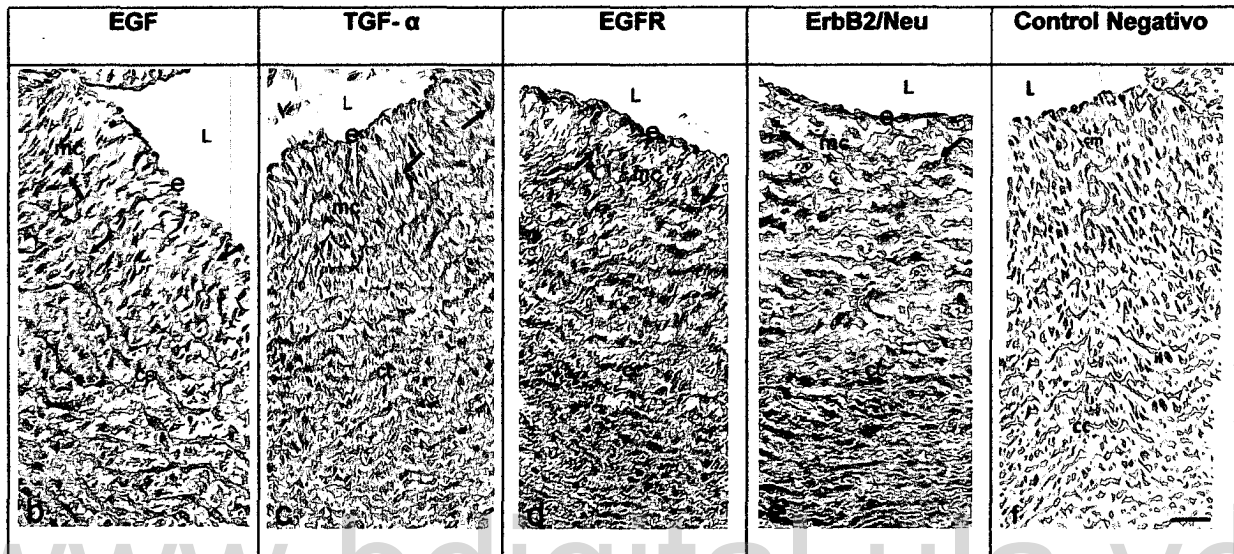
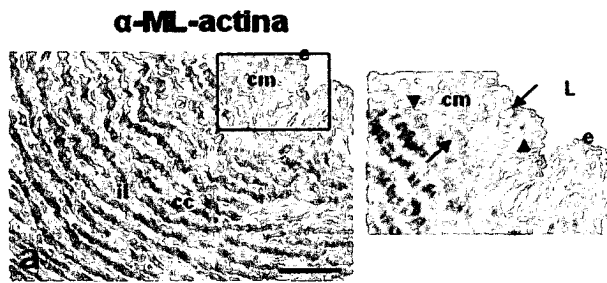


Figura 10. a) Inmunolocalización de α -ML-actina en un corte transversal desparafinado de aorta de embrión de pollo de 12 días de desarrollo. En este estadio es posible distinguir las células de mesénquima adyacentes al endotelio (e) formando un engrosamiento de la íntima (flechas). Una fuerte inmunoreactividad para α -ML-actina es observada en algunas células de mesénquima (cm, cabeza de flechas) y en las células arregladas en forma circular (cc) pero no en las interlamelares (ilm).

b-e) Inmunolocalización de EGF, TGF- α , EGFR y ErbB2/Neu en secciones transversales desparafinadas de aortas de embriones de pollo de 14 días de desarrollo. Una intensa inmunoreactividad para EGF es observada en el endotelio (e), algunas células de mesénquima (cm) y en las células de las capas circulares (cc). Para TGF- α una menor inmunoreactividad es observada en el endotelio (e), algunas células de mesénquima (cm) así como en las células organizadas en capas circulares (cc). Una fuerte inmunoreactividad para ErbB2/Neu y una moderada inmunoreactividad para EGFR son detectadas en la mayoría de las células endoteliales (e), algunas células de mesénquima (cm) y en las células de las capas circulares (cc). **f)** Control negativo. Note que no hay inmunoreactividad cuando el anticuerpo primario ha sido omitido. L, luz del vaso. Barra: a, f, 150 μ m; Barra: b-e, 125 μ m.

cultivos fueron mantenidos en ausencia de VEGF (vehículo) (Figs. 11c, d). Estos resultados preliminares *in vitro* sugieren una posible participación del VEGF en el proceso de TEndoM.

www.bdigital.ula.ve

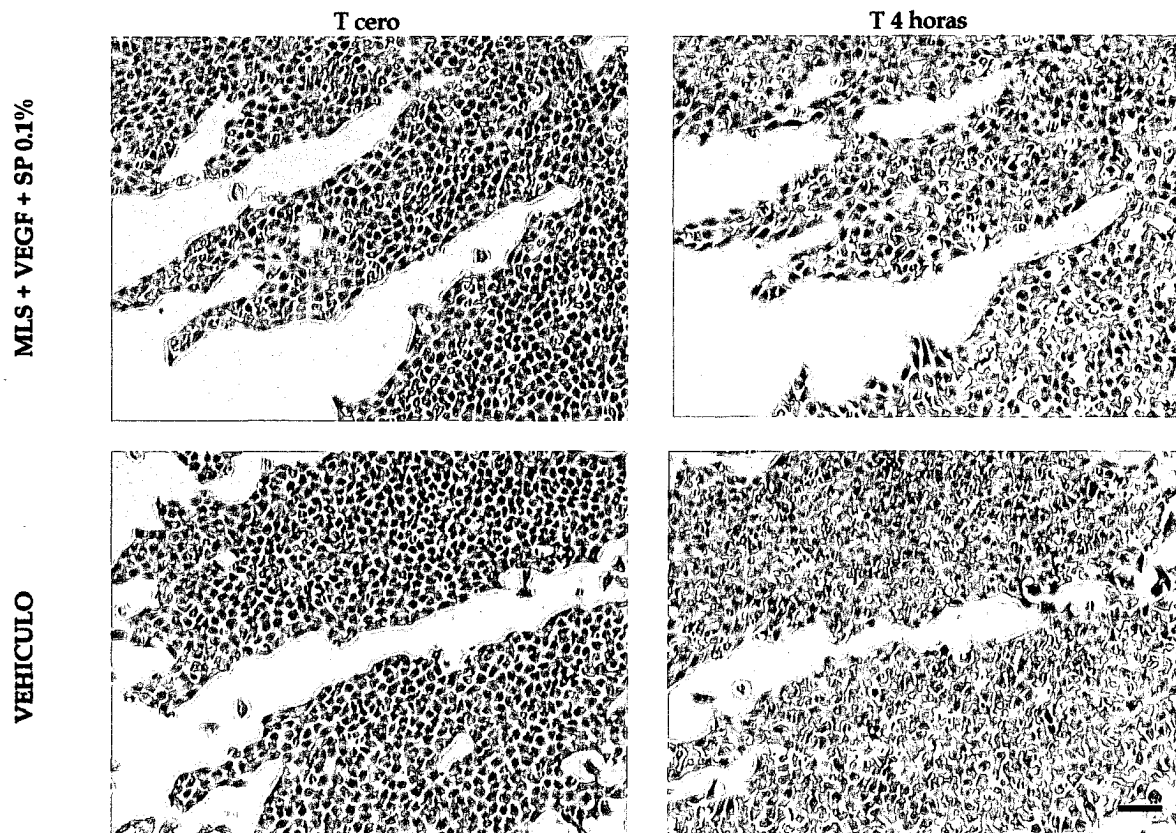


Figura 11.

Representa una secuencia de imágenes de microscopía de contraste de fases de una monocapa de células endoteliales adherida a la superficie de la placa de Petri cubierta con FN y mantenida en presencia de VEGF (20 η g/ml) y SP (0,1%) (a, b) y de otra monocapa que fue mantenida a baja concentración de SP (0,1%) y ácido acético (0,1%) (vehículo) durante 4 horas (c, d). Barra: 150 μ m.

Note que solo cuando las monocapas fueron incubadas con VEGF (20 η g/ml) y SP (0,1%) las células aparecen separándose, despegándose del sustrato y migrando (b).

5. DISCUSIÓN

El presente estudio provee evidencias que nos permiten sugerir que la adhesión de las células endoteliales embrionarias obtenidas de explantes de aorta a la FN es mediada por la integrina β_3 y promovida por el Ca^2 y que la organización de estas células en monocapas de células polarizadas cuando ellas fueron mantenidas en ausencia de MLS o factores de crecimiento, fue establecida por adhesión a la FN y por la formación de los contactos célula-célula o UAs. Esta última involucrando la presencia de β -catenina y p120-catenina, la redistribución de la integrina β_3 y de manera importante, la reorganización de los MTs con la posible participación de algunas tirosinas fosfatasas y tirosinas kinasas (Dejana y col., 2009). Estos eventos celulares son considerados como relevantes para el mantenimiento de la forma y la polaridad apico-basal in vitro y durante el desarrollo embrionario (Bryant y Mostov, 2008; Dejana y col, 2008; 2009; Iruela-Arispe y Davis, 2009). Notablemente, la adhesión a la FN y organización de las células endoteliales en monocapas de células polarizadas implicando la formación de las UAs y la reorganización de los MTs, en ausencia de suero o factores de crecimiento, fue acompañada por la fosforilación de dominio kinasa del EGFR y del ErbB2 y de la translocación nuclear de ambos receptores. Así tenemos que ambos receptores en sus formas fosforiladas fueron detectados en los sitios de contactos célula-célula y en el núcleo de algunas células de la monocapa mediante el uso de anti-fosfo EGFR (Tyr845) y anti-fosfo ErbB2 (Tyr877). En este sentido, el EGFR fosforilado ha sido detectado durante la formación de los contactos célula-célula en monocapas de células epiteliales deprivadas de

suero y mantenidas en presencia de Ca^{2+} , sugiriendo una activación de EGFR independiente del ligando e inducida por su interacción con la E-cadherina o con componentes de las UAs (Erez y col., 2005; Pece y Gutkind, 2000; Takahashi y col., 1997). Es importante mencionar que la localización basolateral de EGFR y ErbB2 junto con los componentes de las UAs ha sido consistentemente reportada en células epiteliales polarizadas (Feigin y Muthuswamy, 2009; Hoschuetzky y col., 1994; Shelly y col., 2003; Tanos y Rodriguez-Boulan y col., 2008). También, estudios en células epiteliales tumorales han indicado que la formación de las UAs mediada por E-cadherina inducen la activación de EGFR en ausencia de ligando, lo cual conduce a un aumento en la expresión de algunos miembros de la familia de las Bcl-2, proteínas consideradas como reguladoras que protegen a las células de la apoptosis (Shen y Kramer, 2004).

La presencia de EGFR y ErbB2 en sus formas fosforiladas o activadas ha sido detectada en el núcleo de células endoteliales fetales de humanos (Bueter y col., 2006) y en células epiteliales normales y tumorales, sugiriendo que estos receptores pueden regular la activación y transcripción de algunos genes y posiblemente otros eventos nucleares (Giri y col., 2005; Wang y col, 2010). En este sentido, es conocido que el enlace (binding) de las integrinas a sus ligandos en ausencia de suero o factores de crecimiento puede promover la supervivencia de la célula al aumentar la transcripción de Bcl-2 (Matter y Ruoslahti, 2001; Zhang y col, 1995) y que el agrupamiento (clustering) y ocupación de las integrinas en ausencia de factores de crecimiento puede provocar también el reclutamiento y activación parcial de diversos RTKs que incluye a los miembros

de la familia del EGFR (Desgrosellier y Cheresh, 2010; Eliceiri, 2001; Huvenners y Danen, 2010; Ivaska y Heino, 2010; Streuli y Akhtar, 2009; Yamada y Even-Ram, 2002). Por ejemplo, en algunas líneas de células epiteliales y en una líneas de células endoteliales de humano (ECV304), la adhesión a FN mediada por integrina β_1 en ausencia de suero o factores de crecimiento produce una rápida fosforilación de EGFR en los residuos Tyr845, 1068, 1086 y 1173 que resulta crítica para la sobrevivencia de estas células (Bill y col, 2004; Cabodi, 2004; Moro y col, 2002). Cabe destacar que estos niveles de fosforilación son mas bajos que aquellos observados con EGF. De manera interesante, algunos estudios han demostrado que la fosforilación del residuo Tyr845 en el dominio kinasa de EGFR requiere de la presencia de la tirosina kinasa Src, la cual es activada y autofosforilada en su residuo Tyr419 de su dominio kinasa luego que la adhesión mediada por la integrina tiene lugar (Bill y col 2004, Cabodi y col 2004). Otros estudios han reportado que la fosforilación del residuo Tyr877 del dominio kinasa de ErbB2 es dependiente de la c-Src (Tyr419) activada o fosforilada (Marcotte y col., 2009; Rivas y col., 2010; Xu y col., 2007); Algunos de ellos sugiriendo que c-Src cuando está activado y fosforilado se asocia específicamente con ErbB2, pero no con los otros miembros de la familia de EGFR (Kim y col., 2005; Marcotte y col., 2009; Muthuswamy y Muller, 1995).

En vista de las observaciones antes mencionadas, en este estudio también investigamos la presencia y distribución de c-Src en ausencia o factores de crecimiento. De manera importante c-Src (Tyr416) fue localizado en sitios de contactos de célula-célula o UAs exhibiendo un patrón similar al observado

para β -catenina, p120-catenina e integrina β_3 . A este respecto, existen evidencias demostrando que c-Src cuando está activado participa durante la adhesión célula-MEC y la formación de las uniones célula-célula donde el podría fosforilar a β -catenina y p120-catenina regulando de esta manera ciertas rutas de señalización que son consideradas esenciales para la supervivencia de la célula (Guarino, 2010; Schlessinger, 2000). De interés, algunos estudios han demostrado que la adhesión de precursores de osteoclasto a FN o vitronectina induce la asociación de c-Src con los MTs y que esta asociación afecta la polaridad de los osteoclastos (Abu-Amer y col., 1997). También, algunos estudios han revelado la interacción recíproca entre c-Src y EGFR en ausencia de factores de crecimiento (de Diesbach y col., 2010; Donepudi y Resh, 2008).

Uno de ellos, sugiriendo que la activación de c-Src puede causar la activación de EGFR, imitando o remedando aquellos efectos ocasionados por bajas concentraciones de EGF sobre la activación, redistribución y señalización del EGFR (de Diesbach y col., 2010). En este contexto, estudios previos han mostrado que el agrupamiento de la integrina β_3 por ligandos tales como FN puede resultar en el reclutamiento y activación de c-Src induciendo la fosforilación de sus residuos Tyr416 o Tyr419 del dominio quinasa (Arias-Salgado, 2003; Desgrosellier y col., 2009; Guarino, 2010; Huveneers y Danen, 2010) y que c-Src activado y fosforilado a su vez fosforila a ErbB2 en su residuo Tyr877 (Marcotte y col., 2009). De manera interesante, estos patrones de fosforilación son diferentes de aquellos que ocurren luego del enlace de EGF.

Por lo tanto, creemos que, en ausencia de suero o factores de crecimiento, la adhesión a la FN de células endoteliales embrionarias mediada por la activación y el agrupamiento de la integrina β_3 , promueve la activación de c-Src, el cual se encuentra asociado con los microtúbulos y que c-Src a su vez contribuye a la formación de los contactos célula-célula o UAs mediante la fosforilación de β -catenina y p120-catenina. Este proceso estaría acompañado por la fosforilación de EGFR y ErbB2 en los residuos tyr845 y tyr877 respectivamente, conduciendo a la activación parcial y a la translocación nuclear de ambos receptores con la consecuente regulación de la expresión de las proteínas Bcl-2 para proteger a las células de la apoptosis inducida por la privación del suero.

En este estudio, encontramos que el cierre de las brechas (re-endotelialización) fue casi completo y que la separación, despegue de las células endoteliales del sustrato y eventual migración también tuvo lugar en los bordes de las monocapas cuando el medio de algunos cultivos fue cambiado a medio conteniendo EGF o TGF- α y bajas concentraciones de SP (0,1%). Estas observaciones son consistentes con la posibilidad de que EGF o TGF- α puedan estar interactuando con aquellos EGFR que permanecieron expuestos o accesibles al ligando en los bordes laterales de las células después de haber removido el explante. Por consiguiente, EGFR estaría formando heterodímeros con ErbB2 y podría ser internalizado, lo cual resulta en la pérdida de los contactos célula-célula debido al remodelado de los MTs y a las alteraciones en la distribución de β -catenina, p120-catenina y de la integrina β_3 . Por lo tanto, mediando la reparación de las brechas y la migración celular. Esta observación

es reforzada por reportes previos indicando que el daño mecánico provocado a monocapas de células epiteliales le permite a ErbB2, el cual está localizado en la superficie basolateral, interactuar con su ligando (heregulina) normalmente secretada en la superficie apical conduciendo a la proliferación, migración y reparación de las brechas originadas (Tanos y Rodriguez-Boulan, 2008; Vermeer y col., 2003). De manera interesante, en este estudio también encontramos cambios en la distribución y organización de c-Src cuando EGF o TGF- α fueron añadidos. Consideramos que tales cambios pueden estar asociados con el remodelado de los microtúbulos y con las alteraciones en la distribución integrinas β_3 , β_1 , β -catenina y p120-catenina ocurridos durante la pérdida de los contactos célula-célula o UAs. Consistente con esto, estudios en células epiteliales estimuladas con EGF han proporcionado evidencias indicando que el remodelado de los MTs induce la activación de c-Src, la cual entonces fosforila a β -catenina y p120-catenina, conduciendo a la alteración de las UAs y de las adhesiones célula-MEC promoviendo la migración celular y la invasión (Guarino, 2010). Es importante señalar que el remodelado del citoesqueleto y la pérdida de los contactos célula-célula han sido correlacionados con una elevada expresión de c-Src activado en células tumorales y durante el proceso de TEM (Alper y Bowden, 2005; Guarino, 2010). En relación a la localización nuclear de p-c-Src (Tyr416) observada durante la estimulación con EGF, evidencias recientes sugieren que la localización de c-Src después de la estimulación con factores de crecimiento regula no solo la fosforilación de proteínas nucleares sino también la estructura de la cromatina (Takahashi, 2009).

En este estudio, la estimulación con EGF o TGF- α también mostró la localización en las adhesiones focales de p-FAK (Tyr397), las integrinas β_3 y β_1 cuando la pérdida de los contactos célula-célula, separación del sustrato y migración endotelial tuvieron lugar. En este contexto, estudios previos han sugerido que el agrupamiento de las integrinas β_3 , β_1 y β_5 ocasionados por ligandos tales como la FN o las alteraciones en el citoesqueleto, pueden resultar en el reclutamiento y autofosforilación de FAK en el residuo Tyr397 y que la FAK, una vez activada, promueve el enlace y fosforilación de c-Src para aumentar la actividad de FAK, conduciendo de esta manera a la formación de un complejo de señalización activado (Ilic y col., 2004; Mitra y col., 2005). Los mismos estudios proponen que este complejo activado afecta no solo el ensamble y desensamble de las adhesiones focales, sino también promueve la migración celular a través de la regulación del citoesqueleto, el reciclaje de integrina y la pérdida de las UAs (Mitra y col., 2005). De manera interesante, el reclutamiento y la internalización por macropinocitosis y redistribución de las integrinas han sido observados durante la migración celular inducida por factores de crecimiento (Gu y col., 2011). Por lo tanto, creemos que la separación de la célula endotelial del sustrato involucrando el ensamble y desensamble de las adhesiones focales y la migración después de la adición de EGF y TGF- α y suero de pollo podrían estar relacionadas con el reclutamiento, internalización y redistribución de las integrinas β_3 y β_1 y con la activación de FAK y c-Src durante la endocitosis de EGFR y ErbB2. Es bien conocido que el enlace de EGF o TGF- α al dominio extracelular del EGFR resulta en la homodimerización o heterodimerización y subsecuente autofosforilación del receptor en sus residuos tirosina. dando inicio a una serie

de rutas de señalización importantes que podrían contribuir en la adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia (Carpenter y Liao., 2009; Olayioye y col., 2000). Estos eventos son seguidos por la reposición del complejo a la superficie celular o por la degradación del mismo a través de la vía lisosomal. Después de la internalización, también puede ocurrir la translocación nuclear de los receptores para regular la expresión de algunos genes (Giri y col., 2005; Lemmon., 2009; Roepstorff y col., 2008; Wang y col., 2010; Yarden y Sliwkowski, 2001). De interés particular, la estimulación de células HeLa con EGF conduce a la endocitosis del EGFR acompañada por el remodelado de los MTs (Kharchenko y col., 2007).

En este estudio, la fosforilación e internalización y la translocación nuclear de p-EGFR y p-ErbB2 fue también observada luego de la adición de EGF o TGF- α y SP. En esta condición el análisis por citometría de flujo reveló una expresión elevada de p-EGFR y p-ErbB2, en contraste con aquella detectada en MLS o ausencia de factores de crecimiento. Consistente con esto, estudios previos han demostrado que el tratamiento de las células endoteliales ECV304 con EGF aumenta los niveles de fosforilación de EGFR, los cuales han sido inducidos por la adhesión a la FN mediada por la integrina (Cabodi y col., 2004). En este mismo orden de ideas, un estudio reciente llevado a cabo por el grupo de Odintsova ha reportado que la adhesión de células epiteliales, mediada por integrina, potencia la fosforilación de EGFR y ErbB2 inducida por EGF o TGF- α facilitando la homo o heterodimerización de estos receptores y que este proceso podría estar acompañado por la reorganización del citoesqueleto (Alexi y col., 2011). De acuerdo con esto, nuestras observaciones

sugieren que la dimerización, activación y fosforilación de EGFR y ErbB2, iniciadas por integrina β_3 , podría ser aumentada por la adición de EGF o TGF- α y que la internalización de esos receptores podría estar acompañada por el remodelado de los MTs, induciendo la activación de c-Src y la fosforilación de β -catenina y p120-catenina para promover la pérdida de la polaridad endotelial y la pérdida de los contactos célula-célula, facilitando la expansión, separación y migración, eventos celulares considerados como esenciales en la progresión de la TEndoM. De manera interesante, la sobreexpresión y/o activación de los EGFRs afecta la polarización epitelial y los contactos célula-célula conduciendo a la TEM de células normales (Feigin y Muthuswamy, 2009). Sin embargo, los mecanismos precisos por los cuales los EGFRs alteran la arquitectura normal epitelial para promover la TEM no han sido del todo elucidados (Feigin y Muthuswamy, 2009).

Además de estos hallazgos, este estudio provee evidencias *in vivo* las cuales indican que EGF, TGF- α así como sus receptores EGFR y ErbB2 están presentes en aquellos estadios del desarrollo del embrión de pollo (días 12-14) donde los engrosamientos de la íntima son claramente evidentes y la TEndoM es un proceso activo. Estos datos son interesantes si consideramos que la expresión *in vivo* de EGF, TGF α así como sus correspondientes receptores ha sido detectada en los engrosamientos de la íntima y en las CMLs de las lesiones ateroscleróticas (Dreux y col., 2006) y que la expresión de ErbB2 y ErbB3 en sus formas activadas ha sido demostrada durante el desarrollo de los cojines endocárdicos (Camenisch y col., 2002), sugiriendo una contribución

importante por parte de estos receptores en el inicio de la aterosclerosis y en el desarrollo de las válvulas cardiacas, respectivamente.

5.1 CONCLUSIÓN

Nuestros hallazgos nos permiten sugerir que la adhesión de las células endoteliales embrionarias a la FN mediada por integrina y la activación y translocación de c-Src, EGFR y ErbB2 así como la presencia de sus ligandos son requeridas para el proceso de TEndoM.

www.bdigital.ula.ve

PERSPECTIVAS

Para seguir dando continuidad al interesante tema del EGF, TGF- α , VEGF y sus receptores y posible participación en el proceso de transición endotelio- mesénquima, se hace necesario el uso de inhibidores específicos que nos permitan observar con mas detalle el comportamiento en términos de separación célula-célula, despegue de las células del sustrato y eventual migración, así como la expresión espacio-temporal de las proteínas involucradas en estas funciones biológicas. Por otra parte, ello nos permitiría indagar sobre las rutas de señalización que se pudieran generar aguas arriba y aguas abajo y que estarían involucradas en la transformación endotelial. Evidentemente que la continuidad de esta investigación de estos estudios pasa por la realización de estudios in ovo los cuales implicarían inoculación de estos factores de crecimiento en huevos fertilizados a distintos estadios del desarrollo embrionario (7,14 y 21 días), así como la neutralización de los mismos para lograr un mejor entendimiento en cuanto a los efectos que son causados por la ausencia o inhibición de los mismos y su participación en el desarrollo cardiovascular y por ende en el tronco arterioso, específicamente la aorta y la pulmonar. Finalmente, dilucidar cómo las señales sinergizan con los factores de riesgo para promover la progresión de las enfermedades vasculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Amer Y, Ross F, Schlesinger P, Tondravi M, Teitelbaum S. (1997). Substrate recognition by osteoclast precursors induces c-Src/microtubule association. *The Journal of Cell Biology*, 137: 247-258.

Akhmanova A, Stehbens S, Yap A. (2009). Touch, grasp, deliver and control: functional cross-talk between microtubules and cell adhesions. *Traffic*, 10: 268-274.

Alexi X, Berditchevski F, Odintsova E. (2011). The effect of cell-ECM adhesion on signalling via the ErbB family of growth factor receptors. *Biochemical Society Transactions*, 39: 568-573.

Alper O, Bowden E. (2005). Novel insights into c-Src. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 1119-1130.

Arciniegas E, Candelle D. (2008). An alternate insulin like growth factor I receptor signaling pathway for the progression of endothelial mesenchymal transition. *Bioscience Hypotheses*, 1: 312-318.

Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. (2007). Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *American J Physiology Lung Cell Molecular Physiology*, 293: L1- L8.

Arciniegas E, Ponce L, Hartt Y, Graterol A, Carlini R. (2000). Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells. *The Anatomical Record*, 258:47-57.

Arias-Salgado E, Lizano S, Sarkar S, Brugge J, Ginsberg M, Shattil S. (2003). Src kinase activation by direct interaction with the integrin β cytoplasmic domain. *PNAS*, 100:13298-13302.

Baum B, Settleman J, Quinlan M. (2008). Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19: 294-308.

Bautch V. (2011). Stem cells and the vasculature. *Nature Medicine*, 17: 1437-1443.

Bill H, Knudsen B, Moores S, Muthuswamy S, Rao V, Brugge J, Miranti C. (2004). Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology* 24:8586-8599.

Bombeli t, Schwartz B, Harlan J. (1998). Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalph. *Journal of Experimental Medicine*, 187: 329-339.

Bryant D, Mostov K. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 887-901.

Bueter W, Dammann O, Zscheppang K, Korenbaum E, Dammann C. (2006). ErbB receptors in fetal endothelium. A potential linkage point for inflammation associated neonatal disorders. *Cytokine*, 36: 267-275.

Cabodi S, Moro L, Bergatto E, Boeri Erba E, Di Stefano P, Turco E, Tarone E, Defilippi P. (2004). Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochemical Society Transactions*, 32: 438-442.

Camenisch T, Schroeder J, Bradley J, Klewer S, McDonald J. (2002). Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors. *Nature Medicine*, 8: 850-855.

Carpenter G, Liao H. (2009). Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Experimental Cell Research*, 315: 1556-1566.

Carrillo LM, Arciniegas E. (2010). The endothelial mesenchymal transition process. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 5: 1-5.

Cierniewska-Cieslak A, Cierniewska C, Blecka K, Papierak M, Michalec L, Zhang L, Haas T, Plow E. (2002). Identification and characterization of two cation binding sites in the integrin β_3 subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 11126-11134.

Cluzel C., Saltel F, Lussi J, Paulhe F, Imhof B, Wehrle-Haller B. (2005). The mechanisms and dynamics of $\alpha_v\beta_3$ integrin clustering in living cells. *The Journal of Cell Biological*, 171:383-392.

Davies PF, Tripathi SC. (1993). Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circulation Research*, 72:239-245.

Davies PF. (2009). Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Natural Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 6: 16-26.

de Diesbach M, Cominelli A, N'Kuli F, Tyteca D, Courtoy P. (2010). Acute ligand-independent Src activation mimics low EGF-induced EGFR surface signalling and redistribution into recycling endosomes. *Experimental cell Research*, 316: 3239-3253.

Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani M. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control vascular permeability. *Journal of Cell Science*, 121: 2115-2122.

Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein B. (2009). The control the vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Developmental Cell*, 16: 209-221.

Desgrosellier J, Cheresh, D. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 10: 9-22.

Donepudi M, Resh M. (2008). c-Src trafficking and co-localization with the EGF receptor promotes EGF ligand-independent EGFR receptor activation and signaling. *Cellular Signalling*, 20: 1359-1367.

Dreux A, Lamb D, Modjtahedi H, Ferns, G. (2006). The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 186: 38-53.

Eisenberg L, Eisenberg C. (2004). Adult stem cells and their cardiac potential. *The Anatomical Record*, 276A: 103-112

Eliceiri B. (2001). Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circulation Research* 89: 1104-1110.

Erez N, Bershadsky A, Geiger B. (2005). Signaling from adherens type junctions. *European Journal of Cell Biology*, 84: 235-244.

Feigin M, Muthuswamy S. (2009). Polarity proteins regulate mammalian cell-cell junctions and cancer pathogenesis, *Current Opinion in Cell Biology*, 21: 694-700.

Fleener BS, Marshall KD, Rippe C, Seals DR. (2011). Replicative Aging Induces Endothelial to Mesenchymal Transition in Human Aortic Endothelial Cells: Potential Role of Inflammation. *Journal Vascular Research* 49: 59-64.

Floor S, van Staveren WC, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C. (2011). Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene* 30:4609-4621.

Forte A, Della Corte A, De Feo M, Cerasuolo F, Cipollaro M. (2010). Role of myofibroblast in vascular remodelling: focus on restenosis and aneurysm. *Cardiovascular Research*, 88: 395-405.

Fuller S, Sivarajah K, Sugden P. (2008). ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44: 831-854.

Geiger B, Yamada K. (2011). Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: 1-21.

Gibbons GH, Dzau VJ. (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *New England Journal Medicine* 330: 1431-1438

Giri D, Ali-Seyed M, Li L, Lee D, Ling P, Bartholomeusz G, et al. (2005). Endosomal transport of ErbB2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 25: 11005-11018.

Glasser SP, Arnett DK. (2008). Vascular stiffness and the “chicken or the egg” question. *Hypertension* 51: 177-8.

Goumans MJ, van Zonneveld AJ, Dijke PT. (2008). Transforming growth factor β -induced endothelial-to-mesenchymal transition: A switch to cardiac fibrosis? *Trends Cardiovascular Medicine* 18: 293-98.

Gu Z, Noss E, Hsu V, Brenner M. (2011). Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *The Journal of Cell Biology*, 193: 61-70.

Guarino M. (2010). Src signalling in cancer invasion. *Journal of Cellular Physiology*, 223: 14-26.

Guarino, M. (2007). Epithelial – mesenchymal transition and tumour invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 2153-2160.

Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, Yoshioka T, Muller W, Inghirami G, Giancotti F. (2006). β_4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell*, 126: 489-502.

Guo W, Giancotti, F. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 816-826

Hahn C, Schwartz MA. (2009). Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature Review*, 10: 53-62.

Hamburger V, Hamilton HL. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamic*. 195: 231-272.

Hoofnagle MH, Thomas JA, Wamhoff BR, Owens G. (2006). Origin of neointimal smooth muscle: We've come full circle. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 26: 2579-2581.

Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *Journal Cell Biology*, 127: 1375-1380.

Huveneers S. Danen E. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science*, 122: 1059-1069.

Illić D, Kovacic B, Johkura K, Schaepfer D, Tomasević N, Han Q, et al. (2004). FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *Journal of Cell Science*, 117: 177-187.

Iruela-Arispe M, Davis G. (2009). Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Developmental Cell*, 16: 222-231.

Ivaska J, Heino J. (2010). Interplay between cell adhesion and growth factor receptors: from the plasma membrane to the endosomes. *Cell Tissue Research*, 339: 111-120.

Jean C, Gravelle P, Laurent G. (2011). Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology. *Oncogene*, 30: 2697-2706.

Kharchenko M, Aksyonov A, Melikova M, Kornilova E. (2007). Epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis is accompanied by reorganization of microtubule system in HeLa cells. *Cell Biology International*, 31: 349-359.

Kim H, Chan R, Dankort D, Zuo D, Najoukas M, Park M, Muller W. (2005). The c-Src tyrosine kinase associates with the catalytic domain of ErbB-2: implications for ErbB-2 mediated signaling and transformation. *Oncogene*, 24: 7599-7607.

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson E. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease *Journal Cell Biology*, 172: 973-81.

Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N. (2000). The regulation of integrin function by Ca^{2+} . *Biochimica et Biophysica Acta*, 1498: 91-98.

Lemmon MA. (2009). Ligand induced ErbB receptor dimerization. *Experimental Cell Research* 315:638-48.

Li J, Bertram J. (2010). Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis. *Nephrology*, 15: 507-512.

Luo B, Springer T. (2006). Integrin structures and conformational signaling. *Current Opinion Cell Biology*, 18: 579-86.

Majesky MW. (2007). Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thrombosis Vascular Biology*, 27: 1-11

Marcotte R, Zhou L, Kim H, Roskelly C, Muller W. (2009). C-Src associates with ErbB2 through an interaction between catalytic domains and confers enhanced transforming potential. *Molecular and Cellular Biology*, 29: 5858-5871.

Matter M, Ruoslahti, E. (2001). A signaling pathway from the $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins that elevates bcl-2 transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 27757-27763.

Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. (2010) Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem like cells. *Nature Medicine*, 16: 1400-1406.

Mironov V, Visconti RP, Markwald RR. (2005). On the role of shear stress in cardiogenesis. *Endothelium*, 12: 259-61.

Mitra S, Hanson D. & Schlaepfer D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 56-68.

Moro L, Dolce L, Cabodi S, Bergatto E, Boeri Erba E, Smeriglio M et al. (2002). Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 9405-9414.

Moro L, Venturino M, Bozzo C, Silengo L, Altruda F, Beguinot L, Tarone G, Defilippi, P. (1998). Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *The EMBO Journal*, 17: 6622-6632.

Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, et al. (2009). Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *Journal of American College Cardiology*, 54: S20-S31.

Mukherjee S, Tessema M, Wandinger-Ness A. (2006). Vesicular trafficking of tyrosine kinase receptors and associated proteins in the regulation of signaling and vascular function. *Circulation Research*, 98: 743-756.

Muthuswamy S, Muller W (1995). Activation of Src family kinases in Neu-induced mammary tumors correlates with their association with distinct sets of tyrosine phosphorylated proteins in vivo. *Oncogene*, 11: 1801-1810.

Nakashima Y, Xiang Cheng Y, Kinukawa N, Sueishi K. (2002). Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: Preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. *Virchows Archives*, 441: 279-88.

Newby AC, Zaltsman AB. (2000). Molecular mechanism in intimal hyperplasia. *Journal Pathology*, 190: 300-309

Olayioye M, Neve R, Lane H, Hynes N. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal*, 19: 3159-3167.

Papusheva, E. & Heinsenberg, C. (2010). Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. *The EMBO Journal*, 29: 2753-2768.

Pece S. & Gutkind S. (2000). Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 41227-41233.

Polyak K, Weinberg RA. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Review Cancer*. 9: 265-73.

Potentia S, Zeisberg E, Kalluri R. (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *British Journal Cancer*, 99: 1375-79

Radisky DC. (2005). Epithelial mesenchymal transition. *Journal Cell Science*, 118: 4325-6.

Rieder F, Kessler SP, West GA, Bhilocha S, de la Motte C, Sadler TM. et al (2011). Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *American Journal Pathology*, 179: 2660-73.

Rivas M, Tkach M, Beguelin W, Proietti C, Roseblit C, Charreau E, Elizalde P, Schillaci R. (2010). Transactivation of ErbB-2 induced by tumor necrosis factor α promotes NF- κ B activation and breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Research Treatment*, 122: 111-124.

Roepstorff K, Grøvdal L, Grandal M, Lerdrup M, van Deurs B. (2008). Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochemistry and Cell Biology*, 129: 563-578.

Sakao S, Hao H, Tanabe N, Kasahara Y, Kurosu K, Tatsumi K. (2011). Endothelial-like cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: crosstalk with myofibroblast-like cells. *Respiration Research*. 22; 12:109.

Savagner P. (2001). Leaving the neighborhood: molecular mechanism involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*, 23: 912-923.

Schlessinger J. (2000). New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell*, 100: 293-296.

Schwartz M. (2010). Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2: 1-13.

Shelly M, Mosesson Y, Citri A, Lavi S, Zwang Y, Melamed-Book N, Aroeti B, Yarden Y. (2003). Polar expression of ErbB-2/HER2 in epithelia: Bimodal regulation by Lin-7. *Developmental Cell*, 5: 475-486.

Shen X, Kramer R. (2004). Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *American Journal of Pathology*, 165: 1315-1329.

Simons M. (2009). VEGF and restenosis: The rest of the story. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 29: 439-440.

Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. (1999). Role $\alpha_v\beta_3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *The EMBO J*, 18: 882-892.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, et al. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92: 1355-74.

Stehbens WE. (1996). Structural and architectural changes during arterial development and the role of hemodynamics. *Acta Anatomical*, 157: 261-274

Streuli C, Akhtar, N. (2009). Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochemistry Journal*, 418: 491-506.

Subbotin VM. (2007). Analysis the arterial intimal hyperplasia: review and hypothesis. *Theoretical Biology Medicine Model*, 31: 4-41.

Takahashi A, Obata Y, Fukumoto Y, Nakayama Y, Kasahara K, Kuga T, et al. (2009). Nuclear localization of Src - family tyrosine kinases is required for growth factor induced euchromatinization. *Experimental Cell Research*, 315: 1117-1141.

Tanos B, Rodriguez-Boulan. (2008). The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene*, 27: 6939-6957.

Zhang Z, Vuori K, Reed J, Ruoslahti E. (1995). The $\alpha_5\beta_1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *PNAS, USA*, 92: 6161-6165.

www.bdigital.ula.ve

Zhang Z, Vuori K, Reed J, Ruoslahti E. (1995). The $\alpha_5\beta_1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *PNAS, USA*, 92: 6161-6165.

www.bdigital.ula.ve