



UNIVERSIDAD DEL BÍO-BÍO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

# **REDUCIDA CAPACIDAD PROANGIOGÊNICA EN RATONES MACHOS DEFICIENTES EN EL RECEPTOR DE ADENOSINA A<sub>2A</sub>**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**AUTOR : TRONCOSO BASSO FELIPE ANDRÉS**

**Profesor Guía : Dr. Carlos Escudero Orozco.**

**CHILLAN, 2015**

## **DEDICATORIA**

**Quienes están y estuvieron presente  
en mi formación académica y humana**

**A mi Madre**

**A mi Abuela**

**y Familia....**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera dar mis agradecimientos al Doctor Carlos Escudero, por su paciencia y por su apoyo en el desarrollo de esta tesis y acogerme en su laboratorio desde el inicio que comencé en éste proyecto.

A mi familia por todo su apoyo emocional y espiritual que me han dado y en especial su amor. El desarrollo de este trabajo fue realizado gracias a la labor realizada con el apoyo del laboratorio de fisiología vascular lugar el cual me acogió y me permitió conocer valiosas personas y que estuvieron constantemente apoyando durante el transcurso del tiempo.

Esta tesis fue financiada por FONDECYT 1140586

## ÍNDICE

1	Introducción.	9
1.1	Endotelio Vascular.	10
1.2	Adenosina: Rol fisiológico.	10
1.3	Receptores proteínas G. (GPCRs)	12
1.4	Receptores adenosina.	13
1.5	Receptor de adenosina A <sub>1</sub> (A <sub>1</sub> AR).	13
1.6	A <sub>1</sub> AR en el sistema cardiovascular.	14
1.7	Receptor de adenosina A <sub>2A</sub> (A <sub>2A</sub> AR).	16
1.8	A <sub>2A</sub> AR y el sistema cardiovascular.	18
1.9	Importancia biológica receptor A <sub>2A</sub> AR.	18
1.10	Receptor A <sub>2B</sub> de adenosina (A <sub>2B</sub> AR).	20
1.11	Importancia biológica (A <sub>2B</sub> AR).	20
1.12	Receptor de adenosina A <sub>3</sub> (A <sub>3</sub> AR).	21
1.13	A <sub>3</sub> AR y el Sistema Cardiovascular.	22
1.14	Angiogénesis mediada A <sub>2A</sub> AR.	24
1.15	Diferenciación de angiogénesis según el sexo del animal.	27
1.16	Estrógenos y receptores de adenosina	30

<b>2 Hipótesis</b>	32
<b>3 Materiales y Métodos.</b>	33
3.1 Obtención de especímenes (murinos).	33
3.2 Reactivos utilizados.	34
3.3 Instrumentos.	35
3.4 Agonistas y antagonistas receptor adenosina.	36
3.5 Aislamiento de células endoteliales de pulmón (CEP)	36
3.6 Selección células endoteliales.	37
3.7 Condición experimental <i>in-vitro</i>	38
3.8 Extracción RNA células endoteliales.	38
3.9 Síntesis cDNA.	39
3.10 Amplificación de DNA.	40
3.11 Extracción y cuantificación de proteínas.	40
3.12 Electroforesis.	41
3.13 Electrotransferencia.	42
3.14 Detección anticuerpo y revelado.	42
3.15 Ensayo de formación de tubos.	43
3.16 Proliferación celular y cuantificación.	43
3.17 Migración celular.	44
3.18 Ensayo de heridas en ratones.	44
3.19 Inmunohistología.	45
3.20 Perfusión Laser Doppler.	45

3.21 Análisis estadístico.	46
<b>4 Resultados.</b>	48
4.1 Caracterización células endoteliales (CEP)	48
4.2 Niveles de RNAm en receptores de adenosina	48
4.3 Proliferación células endoteliales.	49
4.4 Migración celular.	50
4.5 Formación de tubos.	51
4.6 Ensayos in-vivo de cicatrización de herida.	53
4.7 Histología de heridas.	54
4.8 Laser Doppler.	54
<b>5 Discusión y Conclusión.</b>	56
5.1 Modelo celular.	56
5.2 Respuesta angiogénica <i>in vitro</i> según sexo.	58
5.3 Caracterización de angiogénesis in vivo según sexo.	68
<b>6 Bibliografía.</b>	74
<b>7 Tablas.</b>	89
<b>8 Figuras.</b>	91
<b>9 Anexo.</b>	106

## RESUMEN

**Antecedentes:** Adenosina es un nucleósido derivado del metabolismo del adenosin trifosfato que cumple múltiples funciones en el organismo, incluyendo control de la función y formación de vasos sanguíneos. Esta molécula actúa sobre una familia de receptores denominados  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ . Particularmente, el receptor  $A_{2A}$ , tiene un rol estimulador de la formación de vasos sanguíneos (o angiogénesis), a través de la estimulación de proliferación, migración y maduración de células endoteliales. La importancia de este receptor en angiogénesis ha sido mostrada utilizando animales deficientes en el mismo, los cuales presentan una reducción en la capacidad angiogénica. Por otro lado, se conoce que hembras de distintas especies tienen una mayor capacidad angiogénica respecto a los machos. En el presente estudio proponemos que la deficiencia del receptor  $A_{2A}$  de adenosina se asocia a menor capacidad angiogénica, la cual es más evidente en machos que en hembras.

**Objetivo:** Determinar el papel del receptor de adenosina  $A_{2A}$  como modulador del angiogénesis en ratones machos y hembras.

**Metodología:** El presente estudio de tipo experimental, incluye dos modelos de estudio, uno in vitro y otro in vivo. Para el modelo in vitro, se aislaron cultivos primarios de células endoteliales de pulmón de animales controles o deficientes en el receptor  $A_{2A}$  de adenosina ( $A_{2A}AR-KO$ ). Luego de la caracterización del cultivo primario mediante inmunoselección con CD31, las células fueron utilizadas para ensayos de western blot para determinar la presencia de los marcadores endoteliales CD34 y el receptor 2 del factor de crecimiento de endotelio vascular (KDR). Posteriormente, las células fueron utilizadas para extracción de RNA para determinar los niveles de RNA mensajero para los receptores  $A_1$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ . Así como también se utilizaron las células para ensayos de proliferación, migración y capacidad de formación de tubos (angiogénesis in vitro) en ausencia o presencia de los agonistas no selectivos de los receptores de adenosina, NECA; o del agonista selectivo para el receptor  $A_{2A}$ , CGS-21680. Todos los experimentos fueron realizados considerando el sexo de los animales desde los cuales fueron extraídas las células. Para los experimentos in vivo, animales control o  $A_{2A}AR-KO$  fueron utilizados para ensayos de cicatrización de herida provocada en la zona dorsal del animal. Se realizó un seguimiento hasta los 10 días post-herida. En el día 4 post-herida se obtuvieron muestras de piel, las cuales fueron utilizadas para análisis histológico utilizado tinción de hematoxilina y eosina. Se realizó además análisis del flujo sanguíneo mediante laser Doppler.

**Resultados:** Se encontró que las células CD31 positivas, mostraron un aumento significativo de KDR o de CD34 respecto a aquellas células no expuestas a selección por CD31 tanto en células de animales control como de  $A_{2A}AR-KO$ . En hembras se encontró un aumento significativo en los niveles relativos de mRNA para el receptor  $A_{2B}$  (1.8 veces,  $p < 0.05$ ) y el receptor  $A_3$  (2.7 veces,  $p < 0.05$ ) en  $A_{2A}AR-KO$  respecto a su respectivo control (WT); mientras que en el receptor  $A_1$  no se evidencia cambios en los niveles relativos de

mRNA en ambos grupos. Por otra parte, en machos se observó un aumento significativo en los niveles relativos de mRNA para los receptores  $A_1$  (2.1 veces,  $p < 0.05$ ) respecto a sus respectivos controles (WT). En el ensayo de proliferación celular se encontró que las hembras control mostraban una mayor sensibilidad al agonista no selectivo NECA que las hembras  $A_{2A}AR$ -KO, o que los ratones machos control o  $A_{2A}AR$ -KO, en al menos un orden de magnitud. No se observan cambios significativos en la  $\log EC_{50}$  ( $10^{-6.4}$  M, 95%CI  $10^{-7.39}$  a  $10^{-5.54}$  M versus  $10^{-6.1}$  M, 95%CI  $10^{-6.59}$  a  $10^{-5.65}$  M, respectivamente) entre células de hembras o machos control. Únicamente, las células endoteliales de animales control, hembras y machos, presentaron respuesta proliferativa mediada por CGS-21680. Además, en hembras control se mostró que tanto NECA como CGS-21680 incrementaron significativamente la migración celular respecto a la condición basal; situación que no se observó en su contraparte  $A_{2A}AR$ -KO. Es más, en este último grupo, la respuesta a CGS-21680 fue significativamente menor que la observada en los ratones control. Para el caso de los machos, se encontró que únicamente CGS-21680 fue capaz de provocar un aumento significativo (1.3 veces,  $P < 0.05$ ) en la migración celular en ratones control. En ratones  $A_{2A}AR$ -KO, ni NECA o CGS-21680 generaron cambios significativos respecto a la condición basal. Sin embargo, a diferencia de lo observado en hembras, los machos  $A_{2A}AR$ -KO tuvieron una menor respuesta migratoria en todas las condiciones experimentales. Respecto a los ensayos de diferenciación endotelio o angiogénesis *in vitro*, mosque que las células de hembras o machos control incrementaron significativamente en presencia de NECA o CGS-21680, un efecto que no fue observado en células de ratones  $A_{2A}AR$ -KO. Los resultados *in vivo* mostraron que los machos  $A_{2A}AR$ -KO tuvieron una herida más grande que sus respectivos controles ( $0.63 \pm 0.09$  vs  $0.27 \pm 0.01$  mm, respectivamente,  $P = 0.05$ ). Mientras que, en hembras, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre ratones  $A_{2A}AR$ -KO y sus controles a los 10 días de seguimiento. Además, se encontró que los machos  $A_{2A}AR$ -KO tuvieron una dermis más gruesa (1.3 veces,  $P < 0.05$ ), pero una epidermis más delgada (-15%) que las hembras  $A_{2A}AR$ -KO. Finalmente, los resultados muestran que el flujo sanguíneo fue mayor en los animales  $A_{2A}AR$ -KO en hembras y machos, siendo en estos últimos estadísticamente significativo respecto a su respectivo control ( $P = 0.01$ ). De forma interesante, los resultados también muestran que el flujo sanguíneo en hembras  $A_{2A}AR$ -KO fue constante, similar a lo encontrado en ratones hembra control. Sin embargo, en el ratón macho  $A_{2A}AR$ -KO el flujo fue intermitente mostrando una amplia variabilidad en las mediciones.

**Conclusión:** La condición genotípica de deficiencia del receptor  $A_{2A}$  de adenosina genera una adaptación pro angiogénica tanto en hembras como en machos, dándoles una ventaja a las hembras respecto a los machos, tanto en ensayos *in vitro* (migración y diferenciación endotelial (tubos) como la respuesta *in vivo* (cicatrización y flujo sanguíneo).



## **I. INTRODUCCION**

### **I.1 Endotelio Vascular**

El endotelio constituye una capa unicelular continua que sirve de interfase estructural y funcional entre el torrente sanguíneo y la pared vascular. Las células endoteliales (CE) son células altamente especializadas, capaces de sintetizar, almacenar y liberar diferentes moléculas que cumplen funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas (Brunner et al., 2005), por lo cual el endotelio ejerce diversas funciones desde el punto de vista vascular, las que se mencionan: regular la coagulación, trombosis y el sistema fibrinolítico, además modula la actividad de las células musculares lisas (tono vascular/proliferación) y controla el tránsito de macromoléculas y células inflamatorias a la pared (Shibuya, 2006). El recubrimiento endotelial ostenta diferentes receptores que le permiten captar señales físicas, químicas, hormonales e inmunológicas. Cuando estas funciones son alteradas (disfunción endotelial) se favorece el desarrollo de lesiones vasculares (Badimón et al., 2002).

La disfunción endotelial es un desorden sistémico y un temprano evento en la patogénesis de aterosclerosis y otras patologías vasculares, esta es caracterizada por una alteración entre la vasodilatación dependiente del endotelio y vasoconstricción, así como también entre la capacidad antitrombótica y protrombótica (Lu et al., 2010). Esta disfunción endotelial permanece en varios estados afectando la funcionalidad vascular, ya sea evidenciando desarrollo de estados tempranos ateroscleróticos, placas ateromatosas, ruptura, vasoespasmos, formación de trombos, oclusión de vasos e infarto (Brunner et al., 2005).

Para poder modular todas estas funciones, el endotelio sintetiza una serie de sustancias que regulan positiva y negativamente la función de los vasos sanguíneos. Dentro de estas moléculas se encuentra adenosina. En la siguiente sección veremos más en detalle esta molécula.

## **I.2 Adenosina: Rol fisiológico.**

La adenosina (Ado) se compone de una molécula de adenina unida a una molécula de azúcar ribosa (ribofuranosa) a través de un enlace  $\beta$ -N9-glicosídico del cual puede almacenar de manera directa o indirecta en (ADP o AMP) (Fig. 1). La adenina, precursor de adenosina, es parte estructural de moléculas tan importantes para la funcionalidad celular como ATP (Gessi et al., 2010), cofactores necesarios para diversas reacciones enzimáticas tales como reacciones de oxidación –reducción mediadas por nicotin adenin dinucleotido (NAD), nicotin adenin dinucleotido fosfato (NADP), flavin adenin dinucleotido (FAD) entre otras; también puede actuar directamente como segundo mensajero ya sea en forma de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) o adenosina difosfato cíclico (ADPC). Además, esta misma molécula adenina es constituyente de los ácidos nucleicos (Ryzhov et al., 2008). Adenosina por su parte actuaría como una molécula de señalización extracelular siendo liberado en casi todos los tipos de células (Gessi et al., 2011).

Adenosina es sintetizada de varias fuentes metabólicas, siendo la degradación del ATP una de las principales. Por otra parte, el estrés metabólico o daño celular, que se encontrarían asociado a condiciones de isquemia, hipoxia, asma, trastornos neurodegenerativos, enfermedades inflamatorias crónicas entre otras se asocia a

elevación en la concentración extracelular de Ado; (Linden,2001; Fredholm et al.,2001; Gessi et al.,2011;2013). En ese sentido, la concentración extracelular de adenosina está en el rango de 20nM a 200 nM, pero en respuesta a estrés, podría aumentar hasta 300  $\mu$ M (Fredholm, 2011; Burnstock,2008; Lopes et al.,2011).

En esta misma línea, la rápida liberación de Ado, en respuesta a estímulos sobre tejidos tiene un doble papel en la modulación de la homeostasis. En primer lugar, la adenosina extracelular representa una molécula de alarma relevante dado que informaría de lesiones en los tejidos o células, de una manera autocrina y paracrina al tejido circundante (Gessi et al., 2000). En segundo lugar, Ado extracelular generaría una serie de respuestas de los tejidos diana hasta lograr la homeostasis.

Gran parte de los efectos atribuidos a Ado se asocian a la activación de uno o más de sus cuatro receptores transmembrana (AR), los cuales se denomina  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  (Gessi et al., 2000). Sin embargo, Ado también tendría efectos independientes a sus receptores dado que esta molécula puede atravesar la membrana celular y tener un papel en los mecanismos intracelulares, incluyendo la activación de AMP quinasa (AMPK), adenosin quinasa (AK) y la vía S-adenosil-homocisteina (SAHase) (Antonioli et al.,2013).

Pese a esto último, la evidencia apoya la idea de que la capacidad de Ado, al interactuar con sus receptores jugaría un papel clave al tener un efecto modulador, tanto en la salud o en patologías que podrían estar asociadas a procesos inflamatorios o inmunes (Hasko et al., 2009). De esto último existirían muchos enfoques emergentes ya sea a nivel terapéutico que se centrarían en la modulación de Ado en el sistema inmunitario o cardiovascular (Hasko y Pacher, 2008). Precisamente, en esta tesis se abordará uno de los

efectos fisiológicos de Ado más estudiado que corresponde su relación al sistema cardiovascular (Drury y Szent-Györgyi,1999).

### **I.3 Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)**

Los receptores de adenosina pertenecen a la súper familia de receptores asociados a proteína G (GPCRs) (Fredholm et al., 2011). En forma similar a los otros miembros de esta súper familia de proteínas en el genoma de mamíferos; los receptores de adenosina estructuralmente constan de siete dominios transmembrana (7TM) y pueden mediar respuestas celulares a una variedad de señales extracelulares (Lagerstrom y Schiolth, 2008).

Además, respecto a la maquinaria transmembranosa, las GPCRs comparten un dominio proteico (7-TM) en común, el cual evidencian una arquitectura  $\alpha$ -hélice acoplado a proteínas G (Lefkiowitz, 2004). La alfa-hélices están conectados y alternadas mirando hacia el medio extracelular con su grupo amino-terminal, mientras que el extremo carboxilo-terminal está dispuesto hacia la cara intracelular (Schioth, 2008). La unión de un estímulo, o 'primer mensajero', a los dominios extracelulares de GPCR provoca cambios conformacionales en la estructura 7TM que se transmiten a través de los dominios intracelulares del receptor del cual promueve el acoplamiento entre el receptor y su proteína G. En el caso de los receptores estimulatorios de proteína G, como los receptores  $A_{2A}$ , una vez que el receptor se activa, este estimula la activación de la proteína G catalizando el intercambio de guanosina trifosfato (GTP) por difosfato de guanosina (GDP) acoplado a la subunidad  $G\alpha$ , llevando entonces a la disociación del heterodímero  $G\beta\gamma$ .

Una vez disociadas, las subunidades libres  $G\alpha$ -GTP y  $G\beta\gamma$  pueden regular la actividad de los efectores enzimáticos, tales como adenilato ciclasas (AC), fosfolipasa C (PLC) y canales iónicos, para generar moléculas pequeñas o los "segundos mensajeros". Los segundos mensajeros, a su vez, controlan la actividad de las proteínas quinasas que regulan las enzimas clave implicadas en el metabolismo celular (Oldham y Hamm,2008; Ding et al.,2013), ver figura 2.

#### **I.4 Receptores adenosina.**

Cuatro miembros de la familia de receptores Ado / P1 han sido clonados y caracterizados en una variedad de especies, los cuales como se señaló anteriormente son conocidos como receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  (tabla 1 y Figura 3). (Burnstock et al.,2008.). A continuación, veremos más características de cada uno de estos receptores.

#### **I.5 Receptor de adenosina $A_1$ ( $A_1AR$ ).**

El receptor  $A_1$  se encuentra en varias especies animales, incluyendo humanos. Se localiza en el cromosoma 1q32.1 (Megson et al., 1995) y se sabe que tiene una similitud estructural y estrecha a través de las diferentes especies de mamíferos como murinos (Ravelic y Burnstock, 1998). Estudios en ratones, muestran que el receptor  $A_1$  es ampliamente distribuida en el sistema nervioso central, con altos niveles en la corteza cerebral, hipocampo, el cerebelo, el tálamo, el tronco encefálico y médula espinal de rata (Reppert et al.,1991; Dixon et al., 1996). Además, está presente en numerosos tejidos periféricos, incluyendo conductos deferentes, testículos, tejido adiposo blanco, estómago, bazo, hipófisis, suprarrenales, corazón, aorta, hígado, ojos, y vejiga (Reppert et al., 1991;

Dixon et al., 1996). Por otra parte, los niveles bajos se encuentran en pulmón, riñón e intestino delgado (Reppert et al., 1991; Stehle et al., 1992; Dixon et al., 1996), de esto mismo una distribución similar ha sido descrito para los A<sub>1</sub>AR en humanos (Ren y Stiles, 1994).

En cuanto a la transducción de señal, el receptor A<sub>1</sub> está acoplado a miembros de la familia G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> de proteínas G, (descrita anteriormente) por lo cual induce inhibición de la actividad de adenilato ciclasa (AC) (Van Calker et al., 1979). En particular el receptor A<sub>1</sub> se acopla a los canales de potasio, así como los canales de potasio dependientes de ATP (K-ATP), en particular en el tejido cardíaco y las neuronas. Además, recientemente se ha informado que el receptor A<sub>1</sub> activaría además vía proteínas quinasas (MAPK) los cual ayudaría desensibilización y recuperación en patología neurodegenerativo o cardiovasculares (Jajoo et al., 2010).

### **I.6 A<sub>1</sub>AR en el sistema cardiovascular**

A nivel cardiovascular, la activación de receptor A<sub>1</sub> ubicado a nivel de nodo sinusal y atrioventricular, tiene un efecto cronotrópico e inotrópico negativo, lo cual puede causar bradicardia y bloqueo cardíaco, respectivamente. Además, sus efectos inotrópicos negativos provocan una disminución de la contractilidad auricular y duración en el potencial de acción (Fredholm et al.,1989; Hasuo et al.,1992). Recientemente, se ha demostrado que la delección del receptor A<sub>1</sub> suprime la frecuencia cardíaca estimulada por Ado en modelos *in vivo* (Koeppen et al., 2009).

Por otro lado, se ha mostrado también que la estimulación del receptor  $A_1$  ejerce un efecto cardioprotector mediante la inhibición de la liberación de norepinefrina en las terminaciones nerviosas simpáticas (Schutte et al., 2006). Otros estudios (Schneyvays et al., 2005; Grenz et al., 2007); también en roedores, muestran que A<sub>1</sub> protege a los tejidos a través de preconditionamiento isquémico (IPC), que consiste en un breve período de isquemia y reperfusión que puede proteger contra el infarto del miocardio o isquemia en otros tejidos (Schneyvays et al., 2005; Grenz et al., 2007); lo cual ha sido asociado con activación del receptor  $A_1$ , y la vía de señalización de proteína quinasa C (PKC) la cual activaría canales de K-ATP mitocondriales (Kiesman et al., 2009; Solenkova et al., 2006). También a nivel cardiaco, agonistas para el receptor  $A_1$ , por ejemplo, tecadenoson (N6- [3 (R) - tetrahidrofurano] adenosina), se encuentran asociados al desarrollo de arritmias y la fibrilación auricular. Así, los estudios clínicos con tecadenoson intravenosa sugieren que puede reducir la velocidad de conducción atrio ventricular nodal al estimular selectivamente el receptor  $A_1$ , lo cual sería beneficioso en pacientes con fibrilación auricular (Yldiz et al., 2007).

En el riñón, por otro lado, el receptor  $A_1$  media la vasoconstricción, disminución en la tasa de filtración glomerular, inhibición de la secreción de renina. Por lo tanto, los antagonistas de  $A_1$ AR representan una nueva clase de agentes para uso potencial en el tratamiento de la hipertensión y edema (Vallon et al., 2006). De hecho, los antagonistas de  $A_1$  son diuréticos y natriuréticos más eficaces que las tiazidas, con la ventaja añadida de reducir la eliminación de potasio, el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular visto con estos últimos fármacos convencionales (Zhou y Kost, 2006). En este sentido, los

ensayos clínicos, aunque en un número limitado de sujetos, han demostrado que los antagonistas del receptor  $A_1$  producen efectos natriuréticos e hipotensores en pacientes hipertensos y atenúan la disminución inducida por la furosemida de la función hemodinámica renal en pacientes con insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, los antagonistas selectivos para el receptor  $A_1$  estarían dirigidos a la microcirculación renal y que podrían mediar el tratamiento de insuficiencia cardíaca crónica y aguda. En el contexto de la presente tesis, se conoce que la delección de este receptor en ratones genera una disminución en el transporte transcelular de Na/Cl; mientras que su activación, regulada por angiotensina II, provoca la constricción arteriolar aferente (Sun et al., 2001; Schnermann y Briggs, 2008).

De lo indicado, se podría resumir que el receptor  $A_1$ , participa en una serie de funciones cardiovasculares, que implican reducción en la frecuencia y contractibilidad del corazón, mejorando el acondicionamiento cardíaco a la isquemia, teniendo un efecto diurético con ahorro de potasio, e hipotensor.

### **I.7 Receptor de adenosina $A_{2A}$ ( $A_{2A}AR$ ).**

El gen del receptor de adenosina  $A_{2A}$  en humanos ha sido localizado en el cromosoma 22 q11.23 mientras tanto que en ratón se localiza en el cromosoma 10 (MacCollin et al., 1994; Dubey et al., 1996; Deckert et al., 1997). Estructuralmente con 410 aminoácidos (409 en ratón), este receptor es el más grande de los receptores de adenosina, característica que es atribuible a un prolongado C-terminal (Piersen et al., 1994; Jacobson et al., 1997). Su expresión es ubicua, identificándose en bazo, timo,



leucocitos, sangre, plaquetas, vasos sanguíneos, sistema nervioso central, sistema inmunológico entre otros (Meng et al., 1994; Peterfreund et al., 1996; Hasko y Pacher, 2008); encontrándose los niveles más altos de expresión en corazón, pulmones y vasos sanguíneos (Meng et al., 1994; Peterfreund et al., 1996).

El receptor  $A_{2A}$  estimula la actividad de AC a través de su acoplamiento con las proteínas  $G_s$ ; esto conduce a la formación de AMPc y activación de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA), que a su vez fosforila y activa diversos receptores, canales iónicos, fosfodiesterasas y fosfoproteínas, tales como la proteína de ligación en respuesta a cAMP (CREB) (Baraldi et al., 2008). Adicionalmente, también se ha reportado la activación de PKC por la activación del receptor  $A_{2A}$  (Lebon et al., 2011), MAPK, AKT, entre otros. Además, el receptor  $A_{2A}$  puede interactuar con diferentes tipos de canales de  $Ca^{2+}$  asociados ya sea a aumento o disminución del calcio intracelular. Estas múltiples vías de señalización intracelular están relacionadas directa o indirectamente a la larga cola intracelular o extremo C-terminal del  $A_{2A}$  (Hasko y Pacher, 2008). Así, el extremo terminal del receptor  $A_{2A}$  se ha definido como un lugar concurrido donde varias proteínas accesorias, tales como los receptores D2 de dopamina,  $\alpha$ -actina, ADP-ribosilación factor de sitio de nucleótidos abridor, proteasa 4 específica de ubiquitina y la translin asociada a la proteína, pueden interactuar. De lo dicho, se desprende que el extremo C terminal del receptor  $A_{2A}$  permitiría la interacción con múltiples vías de señalización intracelular, lo cual podría explicar también los efectos conflictivos resultantes de la activación de este receptor que en el caso del sistema nervioso central podrían variar entre neuroprotección o neurotoxicidad (Sun et al., 2006).

### **I.8 A<sub>2A</sub>AR y el Sistema Cardiovascular.**

Se ha demostrado que Ado vía activación de receptor A<sub>2A</sub> confiere efectos protectores importantes sobre el sistema cardiovascular. Por ejemplo, se conoce que este receptor se encuentra asociado a vasodilatación en aortas de rata y arteria coronaria bovina (Conti et al., 1993). Además, el receptor de adenosina A<sub>2A</sub> se expresa en las plaquetas, cuya activación ha sido asociada a inhibición de la agregación plaquetaria y la formación de trombos (Varani et al., 2000).

En referencia a ello el agonista selectivo para el receptor A<sub>2A</sub>, Regadenoson (2- [4-(Nmethylcarbamoil) - 1H-pirazol-4-il] Ado) podría mejorar eventos cardiovasculares adversos ya sea en pacientes hipertensos o con historial cardiaco leve-moderado (Cavalcante et al., 2011).

Además, se ha mostrado en modelos animales que ratones deficientes en A<sub>2A</sub> presentan problemas cardiovasculares, así como una pobre y lenta regeneración de los vasos sanguíneos (Kern et al., 2006; Bayes, 2007).

### **I.9 Importancia biológica receptor A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>AR).**

Mediante estudios en genética animales modificados (ratones) para el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina, este receptor ha sido implicado en una amplia gama de eventos biológicos. El receptor A<sub>2A</sub> fue el primer receptor de adenosina que se eliminó genéticamente en un modelo murino (Ledent et al.,1997), principalmente en la línea C57BL / 6 (Chen et al.,2001). Estos animales demostraron varias alteraciones al sistema nervioso central,

incluyendo disminución la actividad exploratoria, aumento de la agresividad e hipoalgesia (Ledent et al., 1997). Además, el knock-out del receptor  $A_{2A}$  (KO- $A_{2A}$ ) en ratones homocigotos se ha asociado con aumento en presión sanguínea, frecuencia cardíaca y agregación plaquetaria (Ledent et al., 1997). En contraposición, otro estudio (Desai et al., 2005) utilizando ratones C57BL / 6 knock-out en el alelo 6 que lo hace no funcional al receptor  $A_{2A}$  no mostro diferencias significativas en la presión arterial.

Otros estudios (Armstrong et al., 2001; Ohta y Sitkovsky, 2001; Cronstein et al., 1990) muestran que la activación del receptor  $A_{2A}$  inhibe la inflamación. Sin embargo, el uso de animales deficientes en el receptor  $A_{2A}$ , ha mostrado resultados contradictorios. Así, por una parte, se ha mostrado que los ratones deficientes en receptor  $A_{2A}$ , presentan daños extensos más prolongados en tejidos y niveles más altos de citoquinas pro-inflamatorias en comparación a los controles no deficientes cuando son expuestos a estímulos inflamatorios como lipoprotein sacáridos (LPS) (Armstrong et al., 2001; Ohta y Sitkovsky, 2001). Por tanto, estos estudios resaltan el rol fundamental del  $A_{2A}$  en la atenuación de la inflamación. En contraposición a estos resultados, otros muestran que los ratones deficientes en  $A_{2A}$  tienen una menor sobrevida cuando son expuestos a bacterias intestinales inducidas por la ligadura cecal. Estas discrepancias, obedecerían al modelo utilizado, inflamatorio vs infeccioso; así como el tiempo de exposición. Pese a ello, el consenso general indica que el rol del receptor  $A_{2A}$ , tendrían un rol protector del tejido. (ver figura 4).

### **I.10 Receptor A<sub>2B</sub> de adenosina (A<sub>2B</sub>R).**

El receptor de adenosina A<sub>2B</sub> se localiza en el cromosoma 17 p12-11.2 en humanos (Jacobson et al., 1995), mientras que en ratones se ubica en el cromosoma 11. Respecto a su estructura, en forma similar a A<sub>2A</sub>, se encuentra acoplado a proteínas G<sub>s/o</sub>, el cual estimula la activación de AC y de PLC en humanos (Feoktistov y Biaggioni, 1995). El receptor es expresado ampliamente en tejidos corporales pero distribuidos de manera desigual.

Estudios moleculares demuestran bajos niveles del receptor A<sub>2B</sub> en todo el cerebro (Stehle et al., 1992; Dixon et al., 1996), médula espinal, pulmones, vasos deferentes, e hipófisis (Stehle et al., 1992); mientras que, por otra parte, se han encontrado niveles altos de expresión en este receptor en tejidos como: ciego, intestino grueso y vejiga urinaria (Stehle et al., 1992). Además, los niveles de mRNA para este receptor ha sido descrito en una variedad de células de la piel ya sea dermis y epidermis en modelos animales (Le Poole et al., 1999). Esto último serviría de evidencia para hacer una aproximación en el rol funcional del receptor A<sub>2B</sub> ya sea en el proceso de angiogénesis o mecanismos inflamatorios.

### **I.11 Importancia biológica receptor A<sub>2B</sub>AR.**

La falta de agonistas específicos para el receptor A<sub>2B</sub>, es una razón importante por la que tan poco se sabe acerca de la funcionalidad de este receptor. A pesar de esta limitación, el receptor A<sub>2B</sub> ha sido implicado en varios eventos biológicos. Este receptor

juega un papel de mediador de la vasodilatación en algunos vasos, tales como aorta de conejos o arteria renal de ratas (Abbracchio et al., 2001), y la arteria coronaria en caninos (Balwierczak et al., 1991), mientras que la vasodilatación en otros vasos estaría mediada por los receptores  $A_{2A}$  (Conti et al., 1993). En este mismo sentido, la inhibición farmacológica utilizando antagonistas selectivos del receptor  $A_{2B}$  sugieren que este receptor está involucrado en la proliferación de células del músculo liso provenientes de aorta de rata (Dubey et al., 1996, 2000).

Por otra parte, el receptor  $A_{2B}$  puede jugar un papel en la mediación alérgica en procesos inflamatorios (Marquardt et al., 1994). En esta línea estudios farmacológicos con Enprofilina (agonista receptor  $A_{2B}$ ) ha tenido efectos terapéuticos positivos en problemas asmático (Feoktistov y Biaggioni, 1996).

Otro estudio en ratones muestra que el receptor  $A_{2B}$  proveniente de células mesénquimales liberan factores proangiogénico, lo que contribuiría a mejorar la reparación y remodelación en células cardiacas producto de infarto al miocardio (Ryzhov et al 2008). En esta misma línea se ha demostrado que el receptor  $A_{2B}$  mediaría la diferenciación de células mesénquimales a osteoblastos lo cual ayudaría a la homeostasis ósea y formación de tejido óseo posterior a fracturas (Shannon et al., 2012).

### **I.12 Receptor de adenosina $A_3$ ( $A_3AR$ ).**

El receptor  $A_3$  de adenosina ( $A_3AR$ ) se encuentra localizado en el cromosoma 1p21-p13, mientras que en ratón se encuentra en el cromosoma 3 (Atkinson et al., 1997). A pesar de encontrarse en distintos organismos, existe una diferencia entre especies en la

estructura del receptor  $A_3$ , compartiendo 74% de identidad en su secuencia entre ratones y seres humanos (Baraldi et al, 2008), lo cual sugiere una diferente funcionalidad entre especies (Baraldi y Borea, 2000). En lo que respecta a su distribución, el receptor de adenosina  $A_3$  estaría ampliamente distribuida en tejidos expresándose en testículos, pulmón, riñones, placenta, corazón, cerebro, bazo, hígado, útero, vejiga, yeyuno, colon proximal, ojo de rata, ovejas y seres humanos (Jacobson, 1998; Gessi et al., 2008).

Al igual que los otros receptores de adenosina, el  $A_3$ , es un receptor acoplado a proteínas G, cuya vía de señalización se asocia a disminución de la activación de AC, con la consecuente reducción de AMPc. Sin embargo, también se ha reportado que  $A_3$  también puede activar la vía de señalización MAPK, lo cual está asociado a la regulación de proliferación celular y diferenciación celular (Raman et al., 2007). En relación a la funcionalidad de este receptor, estudios en líneas celulares de mastocitos de rata RBL-2H3 y cerebros de ratas, evidencian que la estimulación de  $A_3AR$  estaría implicado en el funcionamiento neuronal (Raman et al., 2007).

### **I.13 Receptor de adenosina $A_3$ y el sistema cardiovascular.**

En el sistema cardiovascular la estimulación de  $A_3$  restauraría la reactividad vascular después de un shock hemorrágico (Zhou et al., 2010), así como también tendría un rol cardioprotector. Respecto a este último efecto, varios estudios sugieren que la activación del receptor  $A_3$  es crucial para la cardioprotección durante y después de una isquemia reperusión; más aún, se ha indicado que los efectos cardioprotectores mediados por Ado, atribuibles alguna vez a la activación del receptor  $A_1$ , podrían en

realidad ser parte de la activación del receptor  $A_3$  (Ge et al., 2006), dando cuenta de la dificultad de análisis de esta familia de receptores.

Estudios en animales deficientes en  $A_3$ , han aportado para esclarecer el rol de este receptor a nivel cardiovascular. Por ejemplo, ratones transgénicos deficientes en receptor  $A_3$  que inicialmente mostraron una mejor respuesta cardiovascular ante la isquemia cardiaca, lo cual sugiere un rol protector de la deficiencia de este receptor; lo cual se contrapuso con experimentos de sobreexpresión del mismo  $A_3AR$  en donde se evidenció una disminución del desarrollo de cardiomiopatía (Negro et al., 2002), sugiriendo esta vez un rol cardioprotector de la presencia de  $A_3$ .

El mecanismo molecular de cardioprotección asociado al receptor  $A_3$  se ha atribuido a la regulación de los canales K/ATP, así como la generación de óxido nítrico (NO) (Karjian et al, 2006). Respecto a este último efector, se ha mostrado que la activación de  $A_3$  en cardiomiocitos, es capaz de activar a la NO sintasa inducible (iNOS) vía una cascada señalización dependiente de PI3K (Hussain et al., 2009).

En el contexto del daño aterosclerótico y riesgo cardiovascular, se ha reportado recientemente que Ado estimula la formación de células espumosas, y este efecto se reduciría por los bloqueadores de los receptores  $A_3$  y  $A_{2B}$ ; por tanto, este estudio sugiere que el bloqueo mixto de receptores  $A_3 / A_{2B}$  puede ser útil para prevenir pasos importantes en el desarrollo de la placas ateroscleróticas y riesgos cardiovasculares (Gessi et al., 2010).

En resumen, la evidencia experimental ha podido verificar las diferentes funciones de los receptores de adenosina principalmente a través de estudios *in vivo* en modelos

animales. Por lo tanto, la generación ratones transgénicos deficientes para cada uno de estos mencionados ha demostrado ser valiosa herramienta para conocer la funcionalidad en cada uno de ellos. Por ejemplo, en este estudio, se trabajará con ratones deficientes en el receptor  $A_{2A}$ , en quienes buscamos profundizar el conocimiento sobre los procesos de angiogénesis.

#### **I.14 Angiogénesis mediada por el receptor $A_{2A}$ ( $A_{2A}AR$ ).**

Dentro de las funciones que se pueden desencadenar por la activación de receptores de adenosina, y específicamente el  $A_{2A}$ , haremos énfasis en el proceso de angiogénesis. Así el uso de agonistas en los receptores de adenosina o moduladores de adenosina han mostrado ser capaces de modular la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* (Ohta et al., 2001). Adenosina puede contribuir entre 50-70% de la respuesta angiogénica durante el proceso de cicatrización e inflamación en tejidos (Firestein et al., 1993). Así, se ha mostrado que adenosina tiene efectos mitógenos directos sobre las células vasculares (endotelio, pericitos, células musculares) que pueden contribuir al proceso de angiogénesis. Además, en los sistemas de cultivo de células endoteliales, adenosina vía  $A_{2A}AR$ , estimula la migración, proliferación, y la formación del tubo que constituyen pasos iniciales y fundamentales para la formación de nuevas redes de capilares (Cronstein et al., 1986; Escudero et al., 2013).

En este escenario, la actividad pro-angiogénica de adenosina también se ha atribuido a su capacidad para regular la producción de sustancias pro y anti angiogénicos en células vasculares y células inmunes, las cuales normalmente están presentes en el



microambiente de los tejidos. Además, esta capacidad estaría presente tanto en condiciones de oxígeno ambiental (normoxia) o de deficiencia de oxígeno (hipoxia). En este último caso, hay estudios en los cuales la adenosina generada bajo condiciones de hipoxia o isquemia produce potente vasodilatación, aumentando así la entrega de nutrientes y oxígeno, así como también favoreciendo la llegada de leucocitos, y probablemente células progenitoras circulantes, lo cual potencia el proceso de angiogénesis (Salmon y Cronstein, 1990; Londos et al., 1991).

Por otra parte, en células endoteliales, adenosina vía activación de receptor  $A_{2A}$ , estimula la liberación de varias sustancias pro-angiogénicas dentro de las que se resalta el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Escudero et al., 2013). Así también, adenosina vía receptor  $A_{2A}$ , inhibe la producción de trombospondina-1 un factor anti-angiogénico, lo cual contribuye también a comprender su rol pro-angiogénico (Sun et al., 1999).

Estudios muestran que la activación del receptor  $A_{2A}$  está asociado a diferenciación de macrófagos desde un fenotipo pro-inflamatorio que genera grandes cantidades de interleuquinas, a un fenotipo pro-angiogénico que generaría principalmente VEGF. Este mecanismo particular es probablemente importante en la generación y la reparación de tejidos después de una herida o infección microbiana (Cronstein et al., 2008).

Siguiendo esta línea, la aplicación tópica de un agonista selectivo para el receptor  $A_{2A}$  de adenosina (CGS-21680), ha demostrado promover la cicatrización de heridas, proceso en el cual se requiere la reparación y formación de vasos sanguíneos (Montecinos et al., 2002). Así también se ha mostrado que la administración de CGS21-680 promueve

la migración y proliferación de fibroblastos en la matriz celular de heridas realizadas en ratones (Montecinos et al., 1997). Complementando estos resultados, otro estudio demostró que la aplicación un antagonista selectivo para el receptor  $A_{2A}$  revirtió el proceso de cicatrización (Okusa et al., 2000). Ver imagen 5

Otro estudio (Vega et al., 2002), utilizando otro agonista selectivo para receptor adenosina  $A_{2A}$ , (MRE0094), demuestra que la estimulación de este receptor promueve la cicatrización de heridas en ratones tipo silvestre en forma más rápida que el ratón deficiente en este receptor. Cabe destacar que los resultados además muestran que hubo un marcado aumento en el número de vasos sanguíneos en las heridas de cicatrización de ratones de tipo salvaje tratado con el agonista del receptor de adenosina  $A_{2A}$  en comparación con los controles no tratados. En forma similar, otro estudio (Montesinos et al., 2002) también en ratones deficientes en  $A_{2A}$ , muestran que estos animales formarían un número significativamente menor de vasos sanguíneos durante el proceso de cicatrización de heridas y en respuesta al trauma mecánico. Por tanto, estas evidencias *in vivo* indican que la ocupación del receptor  $A_{2A}$  promueve la angiogénesis.

La literatura revisada aquí indica que la adenosina, que actúa en los receptores  $A_{2A}$ , estimula las funciones de células inflamatorias, células endoteliales y fibroblastos que promueven la curación de heridas, lo cual ha sido confirmado en estudios *in vivo*.

### **I.15 Diferenciación de los procesos de angiogénesis según el sexo del animal.**

Existen múltiples evidencias que sugieren que, a nivel cardiovascular, los individuos de sexo femenino tienen ventajas adaptativas en comparación con los individuos del sexo opuesto. Por ejemplo, en el caso de los humanos, se conoce que las enfermedades cardiovasculares están presentes predominantemente en hombres que en mujeres hasta los 65-70 años de edad (Rosamond et al., 2008). Además, la supervivencia de mujeres con falla cardíaca es mayor a la de los hombres con similar condición (Rosamond et al., 2008). Este efecto cardioprotector ha sido asociado a la presencia de estrógenos (Rossouw et al., 2002), ya que esta hormona es capaz de regular la actividad de vasos sanguíneos, controla la función cardíaca y renal. Por tanto, es claro que las hembras en básicamente todas las especies tienen ventajas adaptativas asociadas a la presencia de hormonas sexuales, lo cual sería una condición evolutivamente conservada a fin de salvaguardar la reproducción de dicha especie.

Además, en el campo de la angiogénesis, se conoce que este proceso es virtualmente ausente en condiciones normales, excepto en el tracto sexual femenino, en donde existe mensualmente un proceso activo de angiogénesis (y neovascularización). Otras asociaciones entre angiogénesis y estrógenos, incluyen por ejemplo la mayor predisposición del sexo femenino a enfermedades como arteritis de Takayasu y lupus eritematoso, ambas condiciones asociadas a proliferación de células endoteliales; o la correlación positiva entre la expresión de receptores de estrógenos, la actividad angiogénica y la invasión de cáncer de mama (ver detalles en Losordo e Isner, 2001).

El mecanismo, por el cual los estrógenos controlan los procesos pro-angiogénico no están totalmente claros, sin embargo, se conoce que dependerían de la presencia del receptor de estrógenos tipo alfa (ER- $\alpha$ ), ya que los ratones deficientes en este receptor presentan alteraciones en la angiogénesis (Johns et al., 1996); mientras que la inhibición farmacológica de este receptor llevaría a inhibición también de angiogénesis (Gagliardi et al., 1993). Estudios in vitro, señalan que los estrógenos (en particular estradiol) incrementa la proliferación y migración de células endoteliales vía activación de ER- $\alpha$  presentes en este tipo de células (Venkov et al., 1996; Kim-Schulze et al., 1996). Además, se conoce que estradiol incrementa la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) o del vasodilatador óxido nítrico (NO) en distintos modelos vasculares (ver detalles en Losordo e Isner, 2001). Ambos componentes, han mostrado un rol pro-angiogénico en células endoteliales (Escudero et al., 2013). En consecuencia, desde el punto de vista pro-angiogénico, las mujeres tendrían ventajas sobre los hombres.

Pese a estas evidencias en ciencia básica, estudios in vivo son controversiales. Por ejemplo, un estudio en humanos muestra que no existe diferencias en la mortalidad o la permeabilidad del injerto a los 30 días o al año de seguimiento entre hombres y mujeres que quienes tuvieron un bypass venoso por isquemia crítica (severa) de la pierna (Nguyen et al., 2009). Utilizando un modelo de isquemia de la pata en animales; para simular isquemia crítica de la pierna, se reconocen diferencias en la capacidad de restaurar el flujo sanguíneo colateral (angiogénesis) en la pata isquémica posterior a una obstrucción entre animales machos y hembras; sin embargo, los resultados son controversiales (Kyriakides et al., 2003; Sieviking et al., 2010; Sigvant et al., 2007). Por ejemplo, Kyriakides y

colaboradores (2003) realizaron estudios de isquemia en la pata de conejos hembras con o sin ooforectomía (extracción de los ovarios), así como en conejos machos. En estos animales analizan la presencia de vasos sanguíneos por parámetros histológicos del tejido isquémico, y reporta que no existen diferencias entre machos o hembras; aunque indican que la ooforectomía afecto negativamente la capacidad de angiogénesis en los conejos hembras. Por otro lado, Peng y colaboradores (2011) en modelos de recuperación del flujo sanguíneo post isquemia de extremidades en ratas, encontró que las hembras tendrían menor recuperación del flujo sanguíneo en comparación a machos, esto acompañado de una pobre remodelación y capacidad vasodilatadora en hembras (Peng et al., 2011). Además, estos autores muestran que las células endoteliales de la aorta de animales hembras tuvieron una menor capacidad proliferativa que aquellas provenientes de ratas macho. A pesar de estos hallazgos, las hembras mostraron una reducida cantidad de músculo liso en las paredes de los vasos analizados en el área post-isquémica, en comparación con los machos, lo cual podría indicar que en el caso de los machos los vasos tendrían una capacidad mayor de vasoconstricción o vasodilatación que su contraparte en las hembras. La relevancia funcional de esta última diferencia entre machos y hembras no está clara.

Finalmente, se conoce también que las hormonas “masculinas” como los andrógenos son capaces de controlar la función vascular. Por ejemplo, Siveking y colaboradores (2010), mostraron que dehidrotestosterona (DHT) aumenta la proliferación, migración y capacidad de formación de tubos en células endoteliales provenientes de machos, pero no aquellas provenientes de hembras. Este efecto se asoció

a la presencia del receptor de andrógenos, ya que la inhibición farmacológica o la represión de este receptor bloquea los efectos en células provenientes de machos. Interesantemente, la sobre-expresión de este receptor en células endoteliales de hembras confiere similares respuestas que los de machos ante la presencia de DHT. Posteriores experimentos in vivo, utilizando ratones orquidectomizados (extracción de los testículos) u ooforectomizados (en el caso de las hembras), muestran que la administración de DHT es capaz de recuperar la reducción en la angiogénesis evidenciada en modelos de isquemia en la pata de los animales en quienes se extirpa quirúrgicamente sus gónadas.

En consecuencia, es claro que los estrógenos, y en general las hormonas sexuales pueden regular los procesos de angiogénesis, y específicamente la proliferación, migración y capacidad de formación de tubos de las células endoteliales en modelos in vitro; así como la capacidad de recuperación post-isquemia en modelos in vivo. Sin embargo, pese a las diferencias enunciadas, al parecer las hembras tendrían una mayor capacidad pro-angiogénica que los machos.

#### **I.16 Estrógenos y receptores de adenosina.**

Las hormonas sexuales, y en particular los estrógenos, pueden modular la expresión de receptores de adenosina, fundamentalmente de los receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_3$  pero no  $A_{2B}$ . Así, estudios con ratas hembra Wistar las cuales se sometieron extracción de ovarios (ovariectomía), revelaron una supresión de los receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_3$  y del receptor de estrógeno (ER) beta, mientras que no hubo cambio para el receptor  $A_{2B}$  o los ER alfa, respecto a ratas control (Rose-Mayer et al., 2003).

Otro ejemplo de interacción receptores de adenosina con hormonas sexuales se ha visto en estudios de cáncer de mamas. Por ejemplo, se ha mostrado en estudios en células de cáncer de mamas que el receptor de adenosina A<sub>1</sub> contribuiría en la activación de la maquinaria transcripcional del receptor beta de estrógeno, el cual, a su vez, está involucrado en el crecimiento de cáncer de mamas (Lin et al., 2010). Por otra parte, la estimulación del receptor de adenosina A<sub>3</sub> con el agonista selectivo N (6) - (3-yodobencil) adenosina-5'-N-metilformamida (IB-MECA) logra disminuir la actividad transcripcional del receptor de estrógeno alfa, disminuyendo la proliferación e induciendo apoptosis en diferentes tipos de células de cáncer de mamas (Lu et al., 2010). En este sentido otros autores indican que la estimulación del receptor de adenosina A<sub>3</sub> mediada por el agonista selectivo LI-529, logra atenuar el crecimiento tumoral *in vivo*, involucrando apoptosis a nivel tumoral (Chen et al., 2007). Estos resultados, dan cuenta de adenosina vía receptores A<sub>1</sub> o A<sub>3</sub>, podrían a su vez regular la expresión de receptores de estrógenos, estableciéndose posiblemente un mecanismo de retroalimentación entre adenosina y estrógenos.

Estas diferencias de género serian un indicio en poder profundizar en que eventos moleculares estarían involucrados y más aún el objetivo esta tesis asociarlos a la capacidad angiogénica mediando por receptores de adenosina.

## 2 Hipótesis

La deficiencia del receptor  $A_{2A}$  de adenosina se asocia a una menor capacidad angiogénica, la cual es más evidente en machos que en hembras.

### **Objetivos General:**

Determinar el papel del receptor de adenosina  $A_{2A}$  como modulador del angiogénesis en ratones machos y hembras.

### **Objetivos Específicos:**

1. Estandarizar cultivo primario de células endoteliales pulmonares de ratón.
2. Identificar los subtipos de receptores de adenosina y su actividad en cultivo primario de células endoteliales de ratones machos y hembras silvestre (WT) y deficientes en el receptor  $A_{2A}$  de adenosina ( $A_{2A}AR-KO$ ).
3. Comparar la capacidad de cicatrización de heridas y flujo sanguíneo entre machos y hembras WT y  $A_{2A}AR-KO$ .



### **3 MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Obtención de especímenes (murinos).**

Los especímenes utilizados en este estudio corresponden a la cepa de ratón tipo C57BLACK/6. Los cuales se formaron dos grupos de estudios: control, control (WT) y knock-out para el receptor de adenosina  $A_{2A}$  ( $A_{2A}AR-KO$ ), separados a su vez por sexo (macho y hembras). Estos animales han sido previamente caracterizados (Chen et al.,2001) los cuales fueron donados gentilmente por el Dr. Jiang-Fan Chen, del Departamento de Neurología de la escuela de medicina de la Universidad de Boston, Massachusetts. Los animales se mantuvieron en condición ambiental, con temperatura (25°C) y humedad controlada, con ciclos de exposición a la luz y oscuridad por 12/12 horas y alimentación periódica al libitum.

Como requisito de experimentación, esta investigación se rige bajo las normas éticas propuestas por Russel y Burch el año 1959 que hacen mención a las tres R en el uso de animales en experimentación. Por ello, los animales son mantenidos en ambientes apropiados para su cría en el Bioterio de la Universidad de Valparaíso (refinamiento); los grupos de comparación (control; (Control) y  $A_{2A}AR-KO$ ) estarán constituidos por un mínimo de tres animales (reducción), y los ensayos in vivo serán complementados con ensayos ex vivo en tejidos (reemplazo).

### 3.2 Reactivos utilizados.

**Abc cam technologies** : Anti-CD-34 antibody (mec 14.7) (ab54211)

**Bio Rad**: Nitrocellulose Membranes 0.45um

**Life Sciences**: Corning transwell permeable matrix gel

**Cell-signal**: VEGF Receptor 2 (55b1) antibody.

**CALBIOCHEM**: Adenosine deaminase 500U

**Gibco Laboratories Life Technologies, Inc.**: Medio-199 (M-199), suero bovino fetal (SBF), penicilina/estreptomicina 100x (10.000 unidades de penicilina, 10.000 gr de estreptomicina, 29.2 mg de L-glutamina por ml de solución salina),

**Invitrogen**: Set de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 100 mM, inhibidor de ribonucleasas (RNase) (40 U/μl), transcriptasa reversa M-MLV (200 U/μl), tampón PCR (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH 8.4), marcador pre-teñido de proteínas para geles de poliacrilamida.

**IDT Technologies**: DNA oligo; mA1 F, mA1-R, A2A-WT F, mA2A-WT R, mA2B F, mA2B-R, mA3 F, mA3 R, neo F, neo R, mLP37 F, mLP37 R.

**Kodak**: material fotográfico X-omat AR film XAR-5.

**Merck & Co., Inc.**: PMSF, isopropanol, formamida y Ponceau-S red.

**Millipore**: Anti-Adenosine Receptor A2a clone 7F6G5-A2.

Anti-Mouse IgG (A9917)

**Sigma-Aldrich**: Monoclonal Anti B-actin clone AC-74

Anti-Rabbit IgG (A9169)

**Sigma Chemical Co.:** Gelatina, 2-mercaptoetanol, glicina, Tritón X-100, albúmina de suero de bovino (BSA), Tween 20.

**Thermo Scientific:** Pierce BCA Protein Assay Kit nº 23225.

**Winkler:** Solución de Chomczynsky con fenol, acrilamida:bisacrilamida 29:1, , PBS 10x (NaCl 1.36 M, KCl 0.007 M, NaHPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.199 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.066 M, pH 7.4), TBE 10x (Tris 0.29 M, ácido bórico 0.89 M, EDTA 0.01 M, pH 8.3), SDS 10x (Tris 0.08 M, Glicina 2.5 M, SDS 0.03 M, pH 8.3), alcohol metílico y etílico, agua libre de nucleasa, cloroformo, tampón de carga 6x azul-celeste (glicina 30%, azul de bromofenol 0.25%, xilen-cianol FF 0.25%), marcador de DNA escala de 100pb, TEMED, agarosa, dodecil sulfato de sodio (SDS).

### **3.3 Instrumentos.**

Agitador magnético IKAMAG® RCT

Balanza precisa 180A

Espectrofotómetro PHOMO

Fuente de poder PowerPac Basic, Bio Rad

Freezer a -70°C Forma Scientific HAIER

Gabinete de flujo laminar Nuair™ Class II

Incubador para cultivo celular Nuair™DH Autoflow

Microcentrífuga refrigerada 5417R

Microondas, LG interwave.

Microscopio invertido acoplado a una cámara digital

pHmetro Radiometer Copenhagen PHM 83 Autocal

Refrigerador y congelador Whirlpool

Set de Micropipetas Transfer Pipet.

Sistema de electroforesis Mini Protean® III, Bio Rad

Sistema de transferencia Mini Trans Blot, Bio Rad

Termociclador Eppendorf Mastercycler Personal

Transiluminador UVP

### **3.4 Agonistas y antagonistas en receptores de adenosina.**

Para los experimentos se utilizó el agonista no selectivo de los receptores de adenosina NECA (5'-(N-etilcarboxamido) adenosina) en concentración de 5 mM, y el agonista selectivo para el receptor  $A_{2A}$  de adenosina CGS-21680 (2-(p-(2-carbonil-etil)-feniletilamino)-50-N-etilcarboxamidoadenosina) concentración stock 10 nM. Las constantes de afinidad de estas moléculas por los receptores de adenosina en ratones han sido previamente establecidas (Fredholm et al., 2001).

### **3.5 Aislamiento de células endoteliales de pulmón (CEP).**

Para realizar el cultivo primario de células endoteliales se obtuvo tejido pulmonar de ratón. En breve, luego de sacrificar a los ratones con una sobredosis de pentotal (1g/kg), se procedió a abrir la caja torácica y extracción de tejido pulmonar bajo condiciones de asepsia y antisepsia. El tejido se sumergió en una solución (10 ml) de medio 199 (M-119) a una temperatura de 4°C. Luego bajo campana de flujo laminar se trabajó con la muestra, donde se procedió a cortar el tejido con tijera hasta que quedar homogenizado en piezas de aproximadamente 1 mm. Luego se traspasa la solución con

tejido a un tubo de 15ml (falcón) y se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet (tejido) con 3 ml de medio 199 (M-199) que incluye además colagenasa tipo-B (1 mg/ml) quedándose en agitación en baño termostático a 37°C por dos horas. Posterior a la digestión enzimática, se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos para luego eliminar el sobrenadante con sumo cuidado, y volver a resuspender con 3ml de PBS-1X 0,1% FBS suero (PBS (mM): NaCl 13.7, KCl 2.7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.9, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8, pH 7.4,) y centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos (lavado) durante tres veces. Finalmente, se resuspendió el pellet con 3 ml de solución de PCM al 20% suero bovino fetal con antibiótico hasta homogenizar sembrando a una placa Petri de 60mm; incubando a condiciones controlada de 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron cambiadas de medio cada 2-3 días, según crecimiento celular.

### **3.6 Selección de células endoteliales.**

Una vez observada la confluencia celular se prosigue a tripzinizar (1ml) (tripsina/EDTA = 0.25/0.2%, 2-4 min, 37°C) para luego centrifugar las células a 1500rpm por 10 min. El pellet de células fue resuspendido en M199 + 5% FBS antes de realizar inmunoselección positiva utilizando micro-esferas magnéticas recubiertas con el anticuerpo *anti*-CD31, el cual reconoce PCAM-1 (platelet endotelial cell adhesión molecule 1) (Dyna, Noruega), con una proporción 48 x10<sup>3</sup> esferas/μl suspensión celular para luego dejarla en agitación por 20 min, a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo se hace la selección acercando un magneto imantado a la suspensión, hasta hacer precipitar las células unidas al anticuerpo; donde finalmente se resuspendió y homogenizó con PCM 20% suero bovino

fetal. Para posteriormente sembrar en placa Petri de 60mm bajo incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> controlada hasta esperar confluencia de las células.

### **3.7 Condiciones de experimentación in vitro.**

Para ver el efecto de los moduladores farmacológicos de sus receptores de adenosina, las células endoteliales fueron incubadas con 3 ml de medio de crecimiento completo (PCM, Medio 199, glutamina, ampicilina/estreptomicina ) suplementado con 5% suero bovino fetal (FBS) para deprivar de manera experimental la presencia de factores de crecimiento en un tiempo promedio de 6 horas previo a cualquier tratamiento. Cada (n) de muestras corresponde a un animal sacrificado, los ensayos fueron hechos por duplicados.

### **3.8 Extracción RNA células endoteliales.**

El RNA de cultivo primario endotelial (~200.000 células) fue extraído lisando las células con solución isotiocianato de guanidina/fenol (Trizol, Invitrogen) (Chomczynski & Sacchi, 1987). A cada placa de cultivo celular, se extrajo el medio y se descartó. Se procedió a la extracción de RNA total con la solución de Chomczynski con fenol, en donde a cada placa de cultivo celular se le adicionó 1 mL de solución Chomczynski con fenol para lisar las células incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente, luego fueron traspasadas a un tubo Eppendorf (1,5 ml). Se adicionaron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de solución de Chomczynski con fenol, agitándose vigorosamente por 15 segundos y se

incubó por 2 – 3 minutos a temperatura ambiente. Luego las muestras se centrifugaron a 12200 x g por 15 minutos a 4 °C, se obtuvieron dos fases: una de fenol – cloroformo de color amarillo y otra superior incolora que contiene el RNA. La fase orgánica fue guardada a -70°C (Bio-Freezer Forma Scientific) la cual sirve para extraer DNA o proteínas, la fase que contiene el RNA se transfirió a otro tubo Eppendorf (1,5 ml) al cual se agregaron 0,5 ml de alcohol isopropílico por ml de solución de Chomczynski con fenol utilizada, se mezcló e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.200 x g por 15 minutos a 4°C. El precipitado de RNA obtenido se observó como una pequeña línea blanca en el fondo del tubo Eppendorf. Se eliminó el sobrenadante y el RNA fue lavado con 0,5mL de alcohol etílico 75%. Finalmente se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos a 4 °C, eliminándose el sobrenadante delicadamente y se dejó secar el precipitado al aire. El RNA obtenido fue disuelto en 10 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

### **3.9 Síntesis cDNA.**

El RNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría ( $A_{260nm}$ ) donde su integridad fue evaluada por la relación de densidad óptica a  $A_{260nm}/A_{280nm}$ . Posteriormente se realizó reacción de transcripción reversa usando oligo dT, *random primers* y la enzima MMLV-RT (Moloney Murine Leukaemia Virus-Reverse Transcriptasa, Promega) el cual se consideró una concentración de 1 µg de RNA para la reacción final. Las condiciones para la reacción con un perfil térmico de 37°C constante por un periodo de 1 hora.

### **3.10 Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La reacción de amplificación se realizó empleando como templado 1  $\mu$ l del cDNA, partidores específicos (0.2  $\mu$ M, sense antisense 0,5  $\mu$ l), 9  $\mu$ l buffer mix PCR (dNTPs 0.2 Mm, 1 unidad de Taq Polimerasa, Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8.4), y agua libre de nucleasas para un volumen final de volumen de 18  $\mu$ l. El programa de perfil térmico utilizado contiene los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. Por último, se realizó una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Para el control de integridad de los cDNAs se realizó reacciones de amplificación del cDNA del gen mLP37. Los productos de amplificación se fraccionaron en geles de agarosa al 1.5 % y visualizados por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta. Las imágenes fueron capturadas utilizando un sistema digital. Los partidores utilizados en este estudio fueron derivados desde las secuencias de los mensajeros de rata anotados en la base de datos GenBank® del Instituto Nacional de Salud de U.S. (NIH). En la Tabla 1 se indican las secuencias de cada par de partidores utilizados.

### **3.11 Extracción y cuantificación de proteínas.**

Las células endoteliales fueron lisadas utilizando 300  $\mu$ l de tampón de lisis proteico (Tris/HCl 63.5 mM pH 6,8; glicerol 10%; SDS 2%; ortovanadato de sodio 1 mM, 4-(2-aminoetil) benzenesulfonil fluoruro (AEBSF) 1 mM y 2-mercaptoetanol 5%) más los inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM; aprotinina 2  $\mu$ M; leupeptina; pepstatina, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l).



La concentración de proteínas de las extracciones se cuantificó en microplaca de 96 Wells utilizando el kit *DC Protein Assay* de Bio – Rad (Bio-Rad, USA), el cual es un ensayo colorimétrico basado en la reacción de la proteína con cobre en medio alcalino y la consecuente reducción del reactivo de Folin. Se construyó una curva de calibración entre 0,5 – 1,5 mg/ml de proteína, utilizándose albumina bovina (BSA, 2 mg/ml) como estándar. En cada pocillo de la microplaca se adicionaron 5 µl de estándar y muestra, luego se adicionó 25 µl de solución A' (mezcla de los reactivos que contiene la solución alcalina de cobre y el reactivo S), y posteriormente se adicionaron 200 µl del reactivo B (reactivo de Folin), se incubó por 15 minutos. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 620nm. Los resultados obtenidos de absorbancia para las muestras fueron interpolados en la curva de calibración para determinar la concentración de cada una de ellas.

### **3.12 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.**

Alícuotas a una concentración de 70 µg de proteína fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 10%). Se utilizó para el montaje de geles el sistema de electroforesis *Mini Protean*® *III* (Bio-Rad, USA). El gel separador y espaciador de 0,75 mm de grosor, se prepararon a partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida 29:1. El gel separador se preparó a una concentración final de poliacrilamida de 10%, conteniendo Tris-HCl 375 mM pH 8,8; SDS 0,1 %; persulfato de amonio 0,04% y TEMED 0,03%. El gel espaciador se preparó a una concentración final de poliacrilamida de 3,8% conteniendo Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 0,1% y TEMED 0,04%.

Las muestras de proteínas totales fueron mezcladas con tampón de muestra (Tris-HCl 0,3125 M, pH 6,8; SDS 10%; sacarosa 50%, azul de bromofenol 0,010%) y fueron cargadas en el gel, realizándose la electroforesis en tampón de corrida SDS 1X (Tris 8 mM, glicina 250 mM, SDS 3 mM, pH 8,3) con una intensidad de corriente de 400 mA por un tiempo aproximado de 2 horas.

### **3.13 Electrotransferencia.**

Terminada la separación electroforética de las proteínas, las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema de *Mini Trans Blot*® (Bio-Rad, USA). Sobre una esponja embebida en tampón de transferencia (Tris 8 mM; glicina 250 mM; SDS 3 mM; metanol 20%, pH 8,3) se depositó un trozo de papel filtro, el gel a transferir, la membrana de nitrocelulosa, otro papel filtro y otra esponja embebida en el mismo tampón. Esto se colocó en una cámara de transferencia repleta de tampón de transferencia. La transferencia es realizada a una intensidad de 400 mA por 1 hora. Una vez cumplido el tiempo, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente.

### **3.14 Detección anticuerpo y revelado.**

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas en agitación por 1 hora con solución de bloqueo (leche descremada 5%; PBS 1X; Tween20 0,1%), enseguida se lavó por 10 minutos con solución PBS1X-Tween20 (0,1%) 3 veces por 10 minutos. Posteriormente se incubó con los respectivos anticuerpos primarios: CD34 (1:1000 v/v); KDR (1:500, v/v) y  $\beta$  actina (1:10000, v/v) en solución de PBS 1X-Tween20 (0,1%) con 1% de leche

descremada con agitación suave overnight. Terminada el tiempo se procedió a lavar las membranas 3 veces con PBS 1X-Tween20 (0,1%) por 10 minutos. Luego se incubó por 2 horas la membrana con anticuerpo secundario anti-raton (1:1500, v/v) o anti-conejo (1:1000, v/v) diluido en PBS-Tween20, en forma correlativa con sus correspondientes anticuerpos primarios. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS1X-Tween20 (0,1%) por 10 minutos. El revelado se realizó utilizando el sistema de quimioluminiscencia (ECL), el cual consiste en mezclar partes iguales de los reactivos: peróxido de hidrógeno y luminol, se vierte sobre la membrana y se incuba por 5 minutos. Se eliminó el exceso de reactivo y se expuso a un film fotográfico por 10 minutos. Se retira el film y se reveló utilizando la solución reveladora y finalmente se fijó con el reactivo fijador.

### **3.15 Ensayo de formación de tubos y cuantificación.**

Las células endoteliales de pulmón ( $4 \times 10^4$ ) se cultivaron en una placa de 96 pocillos cubierta con 40  $\mu$ L Matrigel Sótano Matrix Membrana (Corning, MA, EE.UU.) donde posteriormente se aplicaron fármacos CGS-21680 ( $10^{-6}$  M) o NECA ( $10^{-4}$  M) para luego incubar en condiciones estándares ( $37^{\circ}\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5%) durante 4 horas. Se cuantificó la longitud del tubo usando el "analizador de angiogénesis" plugin disponible en el software ImageJ (NIH, USA).

### **3.16 Proliferación celular.**

Las células endoteliales de pulmón cultivadas se tripzinizan para posteriormente plaquear a una placa de 96 wells, donde se siembran 7000 células suspendidas en M199

suplementado con 20% suero bovino fetal, para luego incubarla a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 12 horas (confluencia 30%). Transcurrido el tiempo se procede a deprivar las células con M199 al 5% suero por 6 horas. Posteriormente se procede aplicar moléculas: 7 µl Adenosine Deaminasa (ADA) en concentración de 0,001 U/ml, 7 µl reactivo de marcaje (Kit 5-bromo-2-deoxyuridine BrdU/ ELISA), y medio 199 al 5% hasta completar 60 µl en cada pocillo, para luego aplicar agonista selectivo A<sub>2A</sub> CGS-21680 o agonista no selectivo adenosina NECA en diferentes concentraciones a un rango de 10<sup>-3</sup> M hasta 10<sup>-8</sup>M por un tiempo de 24 horas.

### **3.17 Migración celular.**

Células endoteliales de pulmón son tripsinizadas y sembradas en placas de 12 pocillos e incubadas a condición controlada de 37°C CO<sub>2</sub> 5% hasta observar 100% confluencia. Posteriormente se realiza raspado de manera vertical con la superficie de una punta de micropipeta. Para luego aplicar moléculas CGS 21680 (10<sup>-6</sup>µM) y NECA (10<sup>-4</sup>µM) de manera independiente e incubar por 12 horas. Transcurrido el tiempo se procede a fijar las células con etanol absoluto al 100% por 20 minutos y lavar 3 veces con buffer PBS 1X, para luego realizar tinción con hematoxilina y observar al microscopio para fotografiar las diferentes condiciones experimentales. Las fotografías son cuantificadas con programa Image J (NIH, USA) donde se mide el área migrada por las células.

### **3.18 Ensayo de heridas en ratones.**

Los especímenes de la cepa CBlack/57 para tipo silvestre y A<sub>2A</sub>AR-KO son anestesiados con ketamina (100 µL), y controlados a temperatura (37°C) bajo condiciones

de asepsia durante el ensayo, en donde son rasurados a nivel dorsal (lomo), para posteriormente realizar una herida (5 mm) con ayuda de un sacabocado (Imagen 6) y luego realizar un seguimiento durante 10 días, con monitoreo e imágenes fotografías de evolución de la herida cada dos días. Con las fotografías obtenidas se cuantifica el diámetro de cicatrización durante el seguimiento en tiempo utilizando el área de herida remanente.

### **3.19 Histología.**

Muestras obtenidas de grupos de estudio fueron utilizadas para ensayos de histológicos. Brevemente, los tejidos fueron obtenidos a los cuatro días posterior a la herida (tiempo máximo de formación de nuevos vasos sanguíneos) y fijados con formalina al 4% por cuatro días (Junqueira et al., 1979) a 4°C para luego ser embebidos en parafina. Posteriormente las secciones de cortes se desparafinaron con lavados secuenciales de xileno, y se rehidrato con etanol para finalmente lavar tres veces con dH<sub>2</sub>O y/o PBS y contrateñir con hematoxilina y eosina.

### **3.20 Perfusión Laser Doppler.**

Las mediciones en ratones hembras y machos se realizaron con el láser Doppler Imager perfusión LDPI "PeriScan PIM II" (Perimed Ltd., Suecia). En ello se utilizó un láser de estado sólido de baja potencia con una longitud de onda de 670 nm. El láser se dirigió hacia el tejido por un sistema de espejos motorizado, y que escanea el área predeterminada, de manera particular se seleccionó el área de herida dorsal al cuarto día

de cicatrización en ratones Control y A<sub>2A</sub>AR-KO y se normalizaron los datos con otra área ubicada a menos de 1 mm en el propio animal, que fue considerada como área control. El efecto Doppler, causada por la interacción entre el láser y los glóbulos rojos, se tradujo como un conjunto de puntos que forman un mapa de colores con una escala cromática del azul al rojo. Además, se proporciona una imagen en blanco y negro basado en el registro total de la luz reflejada. Para los experimentos de tesis, se utilizó la resolución "alta" en el modo individual. La matriz de la muestra: tiene una dimensión de 64 × 64 puntos. La adquisición de cada imagen requiere la inmovilización perfecta del animal durante aproximadamente 5 minutos bajo anestesia general del cual previamente se estabilizó la temperatura corporal. Y crear un plano de 10 centímetros de altura entre el láser y el ratón. Por otra parte, los valores medidos de infusión se obtuvieron en imagen las cuales se seleccionaron regiones de dibujo manual de interés (ROI) a nivel dorsal. A continuación, se calculó la media de perfusión de cada espécimen. Posteriormente el software permitió la exportación inmediata de todos los datos en una hoja de cálculo recopilada en Microsoft Excel.

### **3.21 Análisis estadístico.**

Las variables cuantitativas serán expresadas en media ± S.E.M., mientras que las variables cualitativas serán expresadas en porcentaje. Todos los análisis estadísticos se realizaron en los programas estadístico GraphPad InStat 3.01 y GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., California, USA). Las variables cuantitativas serán analizadas por ensayos de ANOVA no paramétrico, y en los casos en los que exista diferencias

significativas ( $P < 0.05$ ) se utilizará el test Mann-Witney para comparar los pares de los grupos analizados.

## **4 Resultados.**

### **4.1 Caracterización de células endoteliales de pulmón (CEP).**

En la Figura 7, se muestra la caracterización del cultivo primario de CEP. Para la obtención de cultivo enriquecido en células endoteliales se utilizó técnica de inmunoselección asociado a un anticuerpo anti-CD-31 (ver Materiales y Métodos). Se encontró que las células CD31 positivas, mostraron un aumento significativo de marcadores endoteliales como el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial (KDR) o de CD34 respecto a aquellas células no expuestas a selección por CD31 (Figura 7B y 7C). Así, respectó a las células no seleccionadas con CD31, los niveles de KDR fueron 2.4 y 1.8 veces más alta en células CD31 positivas provenientes de animales WT o A<sub>2A</sub>AR-KO, respectivamente. En forma similar, los niveles de CD34 fueron 1.9 y 1.5 veces más alta en células CD31 positivas provenientes de animales WT o A<sub>2A</sub>AR-KO, respectivamente.

Una vez caracterizadas las células se sometieron a ensayo de formación de angiogénesis in vitro, en los cuales se evidenció formación de estructuras tubulares en matrigel en forma independiente de la concentración de FBS utilizado en el medio de cultivo (0,1- 1- y 2%) y tan temprano como a las 4 horas de cultivo (Figura 7D).

### **4.2 Niveles de mRNA para los receptores de adenosina.**

La extracción de RNA de células endoteliales en ratones control y A<sub>2A</sub>AR-KO permitió realizar ensayos moleculares, particularmente sintetizando cDNA, y su posterior realización en PCR semicuantitativo, del cual se caracterizó todos los receptores, más gen identificador del sexo (Jarid) y control de carga (mlp27) (ver tabla de partidores).



La comparación inter-genero, mostro diferencias estadísticamente significativas en los niveles de mRNA para el receptor  $A_1$  (Friedman test, 9.9,  $p=0.006$ ),  $A_{2B}$  y  $A_3$  (Friedman test, 9.3,  $p=0.01$ , en ambos casos). Sin embargo, no existió diferencias significativas cuando se comparó hembras vs machos en su respectivo grupo,  $A_{2A}AR-KO$  o WT.

Al analizar los resultados intragrupo, en hembras se encontró un aumento significativo en los niveles relativos de mRNA para el receptor  $A_{2B}$  (1.8 veces,  $p<0.05$ ) y el receptor  $A_3$  (2.7 veces,  $p<0.05$ ) en  $A_{2A}AR-KO$  respecto a su respectivo control (WT); mientras que en el receptor  $A_1$  no se evidencia cambios en los niveles relativos de mRNA en ambos grupos (Figura 8A). Por otra parte, en machos se observó un aumento significativo en los niveles relativos de mRNA para los receptores  $A_1$  (2.1 veces,  $p<0.05$ ) respecto a sus respectivos controles (WT). En cambio, los niveles de mRNA para el receptor  $A_{2B}$  presentaron una tendencia a disminuir, y los del receptor  $A_3$  a aumentar en el  $A_{2A}AR-KO$  macho versus sus respectivos controles, aunque estas diferencias no alcanzaron significancia estadística ( $p=0.1$ , en ambos casos).

#### **4.3 Proliferación células endoteliales.**

En el ensayo de proliferación celular se utilizaron células endoteliales de pulmón obtenidas de ratones  $A_{2A}AR-KO$  y ratones control (WT) ya sea hembras o machos. En estos estudios se encontró que las hembras WT mostraban una mayor sensibilidad al agonista no selectivo NECA que las hembras  $A_{2A}AR-KO$ , o que los ratones machos WT o  $A_{2A}AR-KO$ , en al menos un orden de magnitud (Figura 8, y Tabla 2).

Además, en la figura 9A muestra la dosis respuesta de células endoteliales de ratones control y A<sub>2A</sub>AR-KO en hembras al incubarse con NECA observándose diferencia significativa en la logEC<sub>50</sub> en A<sub>2A</sub>AR-KO respecto a su respectivo control (Tabla 2). Por otro lado, la curva dosis respuesta para NECA en machos no muestra cambios significativos en los log EC50 (figura 9B, Tabla 2).

En lo que respecta a la estimulación con el agonista selectivo para A<sub>2A</sub>, CGS-21680 (10<sup>-6</sup> M x 24 h) en células control provenientes de hembras o machos (Figura 9C), no se observan cambios significativos en la logEC<sub>50</sub> (10<sup>-6.4</sup> M, 95%CI 10<sup>-7.39</sup> a 10<sup>-5.54</sup> M versus 10<sup>-6.1</sup> M, 95%CI 10<sup>-6.59</sup> a 10<sup>-5.65</sup> M, respectivamente). Además, a partir de estos datos, en la figura 9D, se incluye la respuesta a CGS-21680 en ratones control y A<sub>2A</sub>AR-KO. La respuesta proliferativa evidenciada en hembras y machos control fue significativamente mayor que sus contrapartes A<sub>2A</sub>AR-KO.

#### 4.4 Migración celular.

La migración celular fue realizada en ensayos de cierre de herida en la zona central de la placa utilizando una punta de pipeta de 1 ml en presencia (12 h) o ausencia de agonistas de receptores de adenosina, como se describe en Métodos (Figura 10).

La comparación intergrupo no se encontraron diferencias significativas en las condiciones basales (en ausencia de agonistas) en los cuatro grupos de comparación, machos y hembras, control o A<sub>2A</sub>AR-KO. Sin embargo, cuando se comparó la respuesta a NECA (Kruskal-Wallis 12.6; p=0.005) o a CGS-21680 (Kruskal-Wallis 15.7; p=0.001) las diferencias fueron estadísticamente significativas.

La comparación intragrupo en hembras mostró que tanto NECA como CGS-21680 incrementaron significativamente la migración celular respecto a la condición basal; situación que no se observó en su contraparte  $A_{2A}AR$ -KO. Es más, en este último grupo, la respuesta a CGS-21680 fue significativamente menor que la observada en los ratones control.

Para el caso de los machos, se encontró que únicamente CGS-21680 fue capaz de provocar un aumento significativo (1.3 veces,  $P < 0.05$ ) en la migración celular en ratones control. En ratones  $A_{2A}AR$ -KO, ni NECA o CGS-21680 generaron cambios significativos respecto a la condición basal. Sin embargo, a diferencia de lo observado en hembras, los machos  $A_{2A}AR$ -KO tuvieron una menor respuesta migratoria en todas las condiciones experimentales.

#### **4.5 Formación de tubos.**

Para analizar diferenciación endotelial, se utilizó el ensayo de formación de tubos en matrigel utilizando los cuatro grupos de comparación, en ausencia o presencia (6 h) de los agonistas NECA o CGS-21680. Para la descripción del fenómeno se utilizan dos parámetros, el primero la formación de redes (branches) y el segundo la longitud de los tubos formados, ambos fenómenos complementarios, aunque no necesariamente homologables.

Respecto a la formación de redes, la comparación intergrupo mostró que tanto en condiciones basales (Kruskal-Wallis 9.6;  $p = 0.005$ ), como NECA (Kruskal-Wallis 7.4;  $p = 0.04$ ) o CGS-21680 (Kruskal-Wallis 13;  $p < 0.0001$ ) las diferencias fueron estadísticamente

significativas. El análisis intragrupo en hembras se encontró que NECA y CGS-21680 incrementaron significativamente la formación de redes en ratones control, mientras que únicamente NECA lo hizo en ratones hembra del grupo  $A_{2A}AR$ -KO respecto a sus respectivas condiciones basales sin agonistas (Figura 11A y 11B). Por el contrario, CGS-21680 no tuvo efecto en ratones  $A_{2A}AR$ -KO, cuya respuesta fue significativamente menor que su correspondiente condición en el grupo control tanto en hembras como en machos. Respecto a los machos, en forma similar a lo evidenciado en hembras, ambos agonistas incrementaron significativamente la formación de redes en los animales control; sin embargo, en ratones  $A_{2A}AR$ -KO, tanto NECA como CGS-21680 no generaron cambios significativos respecto a su respectiva condición basal (Figura 11E).

Cuando se analizó el indicador de longitud de tubos, la comparación intergrupo mostró que tanto en condiciones basales (Kruskal-Wallis 9.2;  $p=0.01$ ), como NECA (Kruskal-Wallis 15.3;  $p=0.001$ ) o CGS-21680 (Kruskal-Wallis 14.3;  $p<0.0001$ ) las diferencias fueron estadísticamente significativas. Interesantemente, las hembras del grupo  $A_{2A}AR$ -KO, mostraron un aumento en la longitud de los tubos en todas las condiciones experimentales, ya sea con o sin agonistas (Figura 11C y 11F). Por el contrario, la longitud de los tubos en machos  $A_{2A}AR$ -KO fueron significativamente menores que sus respectivas contrapartes en ratones control en todas las condiciones experimentales, llegando a ser estadísticamente significativas aquellas en donde las células se incubaron con ambos agonistas.

El análisis intragrupo en hembras se encontró que NECA y CGS-21680 incrementaron significativamente la longitud de los tubos en ratones control, mientras

que únicamente CGS-21680 redujo este indicador en ratones hembra del grupo  $A_{2A}AR$ -KO respecto a sus respectivas condiciones basales sin agonistas (Figura 11A y 11C). Respecto a los machos control, contrario a lo evidenciado en hembras control, ambos agonistas no modificaron significativamente la longitud de los tubos; sin embargo, en ratones  $A_{2A}AR$ -KO, NECA aumento ligera pero significativamente (1.1 veces,  $p < 0.05$ ), mientras que CGS-21680 disminuyo (12%,  $p < 0.05$ ) la longitud de los tubos respecto a su respectiva condición basal (Figura 11F).

#### 4.6 Ensayos in vivo de cicatrización de herida

Para evaluar si las diferencias en la respuesta angiogénica evidenciada en células provenientes de animales machos y hembras  $A_{2A}AR$ -KO, podrían también modificar la respuesta in vivo, realizamos ensayos de cicatrización de heridas en los cuatro grupos de comparación. Para ello, se procedió a realizar una escisión de diámetro de 10mm a nivel dorsal en ratones control y  $A_{2A}AR$ -KO separados por sexo previamente caracterizados (ver Métodos). En ellos se realizó un seguimiento temporal durante diez días (T-10), el cual, durante ventanas de tiempo de dos días, se chequeaba la evolución de la lesión y su posterior medición (Figura 12A).

La figura 12B muestra la cuantificación en dos ventanas temporales 4 y 10 días. No existió diferencias significativas en el tamaño de la herida a los 4 días, aunque los ratones  $A_{2A}AR$ -KO tendieron a ser más grandes que sus respectivos controles en machos y hembras. Se observó diferencias significativas al final del seguimiento (día 10), en donde los machos  $A_{2A}AR$ -KO tuvieron una herida más grande que sus respectivos controles (0.63

$\pm 0.09$  vs  $0.27 \pm 0.01$  mm, respectivamente,  $P=0.05$ ). Mientras que, en hembras, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre ratones  $A_{2A}AR-KO$  y sus controles ( $0.48 \pm 0.06$  vs  $0.30 \pm 0.05$  mm, respectivamente,  $P=0.28$ ).

#### **4.7 Histología de heridas.**

Para el análisis de cortes histológicos se obtuvieron muestras de lesiones cutáneas del día cuatro (T-4) de cicatrización, en donde ocurre la máxima angiogénesis (referencia) en los cuatro grupos de estudio. Los cortes fueron fijados en formalina y contra-teñidos con hematoxilina/eosina (ver Metodología) y observados a microscopio a un aumento de 100 X. Se cuantificó la longitud de la dermis y de la epidermis (Figura 13A 13C).

La longitud de la epidermis y la dermis fueron significativamente más gruesas en hembras control en comparación con los otros tres grupos (Friedman test 12,  $P<0.0001$ ). Además, tanto las hembras (-60% y -20%, respectivamente) como los machos (-20% y -19%, respectivamente)  $A_{2A}AR-KO$  tuvieron una epidermis y dermis más delgada que sus referentes en animales controles. A pesar de estas diferencias respecto a los ratones control, al comparar entre animales  $A_{2A}AR-KO$ , se encontró que los machos tuvieron una dermis más gruesa (1.3 veces,  $P<0.05$ ), pero una epidermis más delgada (-15%) que las hembras  $A_{2A}AR-KO$ .

#### **4.8 Laser Doppler.**

Se midió el flujo sanguíneo en la piel de ratones hembras y machos de los grupos control y  $A_{2A}AR-KO$ . A ellos se realizó un barrido con Laser Doppler en el área dorsal, la

cual contenía una lesión cutánea con una cicatrización de cuatro días (T-4). Para La medición se seleccionó el área lesionada y otra área con tejido sano con el fin de tener un control interno de medición (Figura 14A a 14D). Los resultados muestran que el flujo sanguíneo fue mayor en los animales  $A_{2A}AR$ -KO en hembras y machos, siendo en estos últimos estadísticamente significativo respecto a su respectivo control ( $P=0.01$ ).

De los resultados también se evidencia que el flujo sanguíneo en hembras  $A_{2A}AR$ -KO fue constante, similar a lo encontrado en ratones hembra control. Sin embargo, en el ratón macho  $A_{2A}AR$ -KO el flujo fue intermitente mostrando una amplia variabilidad en las mediciones, actualmente estamos analizando matemáticamente este comportamiento diferencial en el flujo.

## 5 DISCUSIÓN Y/O CONCLUSIÓN.

En este estudio se realizó una aproximación respecto al papel de los receptores de adenosina y el rol que tienen al mediar el proceso de angiogénesis referente al género para ello se utilizó como herramienta de estudio, un modelo animal en ratón el cual es deficiente del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>AR-KO). Los hitos que marcan esta tesis son: 1) Cultivo celular primario de endotelio pulmonar. 2) Caracterización funcional de la respuesta angiogénica mediada por receptores de adenosina *in vitro* según sexo. 3) Caracterización funcional de angiogénesis *in vivo* según sexo.

### 5.1 Modelo celular.

Para realizar ensayos *in vitro* se obtuvo un cultivo enriquecido en células endoteliales pulmonares, ya que el pulmón posee una gran vascularización, siendo una de las fuentes más ricas de endotelio microvascular. Esto es particularmente relevante para esta tesis, ya que el endotelio microvascular es más sensible a los estímulos pro y anti-angiogénico que los endotelios de la microcirculación (Dye et al., 2004; Feoktistov et al., 2004). Sin perjuicio de ello, además este tipo celular, en forma similar a lo encontrado en otros endotelios, tiene la capacidad de síntesis y liberación de agentes vasoactivos como: angiotensina II, prostaciclina, tromboxano A<sub>2</sub>, óxido nítrico (NO) y endotelinas, que regulan el tono vascular y la vasoconstricción pulmonar (Nieman, 2003). Además, el endotelio es capaz de producir enzimas y moléculas transductoras de señales



intracelulares y moléculas de adhesión celular; los cuales permitían la formación y regeneración de lechos vasculares (Orfanos et al., 2004).

Existen múltiples marcadores de células endoteliales. De modo concreto dos marcadores moleculares se utilizaron para identificar el endotelio vascular en este estudio, a mencionar: CD-34 y el receptor de crecimiento endotelial tipo 2 (VEGFR-2 o KDR). En este sentido, la expresión del VEGFR-1 (o Flt-1) y VEGFR-2 se ha detectado casi exclusivamente en células endoteliales (referencia), aunque a nivel pulmonar otros tipos celulares también lo expresarían, incluyendo: células alveolares tipo II, células epiteliales de las vías respiratorias, células mesénquimales (Mura et al., 2004). En nuestro estudio, la naturaleza endotelial de las células utilizadas fue además demostrada por la presencia de CD34 y la capacidad de formación de tubos sobre matrigel.

En el sentido más amplio, el correcto funcionamiento de las células endoteliales permitiría mantener la integridad funcional y estructural para una adecuada homeostasis cardiovascular, pulmonar y sistémica (Nieman, 2003). Las células endoteliales presentan una alta especialización según el tejido en el cual fueron aisladas (Chi et al., 2003), de manera que es de esperarse que las células endoteliales pulmonares presentan características particulares. En el caso del pulmón, es el único tejido adulto con doble presión desde la circulación general y desde la circulación pulmonar, además de ser el único órgano que recibe todo el gasto cardiaco directamente desde el corazón. Además, la microvasculatura bronquial juega un importante rol en mantener la homeostasis de la vida área, a través de la contribución sobre la entrega de células de la inmunidad y reparación de tejido; además de entregar nutrientes y agua al tejido, el cual sirve para

humidificar el aire inhalado (Guyton, Fisiología Medica). Los vasos pulmonares en todo nivel, tienen una fina capa muscular, y a nivel de la circulación bronquial y del parénquima pulmonar estos vasos se anastomosan fácilmente (Alagappan et al., 2013). Respecto a angiogénesis, el endotelio pulmonar, en forma similar a lo que ocurre en otros tejidos adultos, tiene una limitada capacidad angiogénica, ya que las células adultas se encuentran normalmente en estado de quiescencia (Carmeliet et al., 2013). Sin embargo, en condiciones de estrés, esta capacidad se reactiva, como por ejemplo se ha demostrado que el número de vasos sanguíneos pulmonares incrementa durante el asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (ver detalles en Alagappan et al., 2013); justamente condiciones que cursan con hipoxia tisular, uno de los estímulos más importantes para la liberación de adenosina. Por tanto, en el contexto de la presente tesis, las células endoteliales pulmonares constituyen un buen modelo de angiogénesis por varias razones entre ellas, fácil acceso, respuesta angiogénica a la hipoxia, y presencia de receptores de adenosina (ver más abajo).

## **5.2. Caracterización funcional de la respuesta angiogénica mediada por receptores de adenosina in vitro según sexo.**

Una de las moléculas señalizadores que se liberan frente a condiciones de estrés corresponde al nucleósido de adenosina, el cual interactúa con sus receptores de adenosina descritos previamente. La presencia de los receptores de adenosina, principalmente el A2A, en la circulación pulmonar ha sido descrita desde los años 90s por McCormack y colaboradores (McCormack DG et al., 1989), quienes encontraron que

adenosina generaba vasodilatación en arterias pulmonares. Además, otros estudios han mostrado que adenosina puede generar apoptosis en células endoteliales de la arteria pulmonar, lo cual fue inicialmente interpretado como un mecanismo de autorregulación de daño vascular y angiogénesis en situaciones de estrés como hipoxia pulmonar (Dawicki et al., 1997). Estudios más recientes, utilizando células endoteliales de la arteria pulmonar humana, indican que la activación de receptores A1 por adenosina o por lipopolisacárido (LPS) induce la liberación de interleuquina 6 (IL-6) y tromboxano A2, ambas moléculas relacionadas con respuesta vascular y citotóxica asociada a la presencia de infecciones pulmonares por Gram-negativos (Wilson y Batra, 2002).

En el campo de las enfermedades pulmonares, se conoce también que las inflamaciones crónicas, como aquellas producidas por asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, llevan a una mayor formación de vasos sanguíneos o a una remodelación de los mismos. Particularmente, se conoce que el endotelio aislado de los vasos sanguíneos que nutren a los vasos sanguíneos (*vasa vasorum*), tienen capacidad proangiogénica mayor que los endotelios de la arteria pulmonar o de la aorta (Gerasimovskaya et al., 2008). En estas células endoteliales del *vasa vasorum* se ha mostrado que los niveles de ATP, el precursor de adenosina, genera un aumento en la proliferación por una vía dependiente de PI3K/Akt/mTor y ERK1/2 (Gerasimovskaya et al., 2008), sin embargo no se conoce si esta acción está o no relacionada con la presencia de adenosina.

La presencia del receptor A<sub>2A</sub> ha sido ampliamente caracterizada en el pulmón, en donde cumpliría una función en la reparación del tejido y como anti-inflamatorio (Hasko y

Pacher, 2008). Estudios en animales deficientes en este receptor, han mostrado que la inyección intrapleural de LPS se asocia a una marcada alta respuesta inflamatoria respecto a los animales control (Hasko y Pacher, 2008). Además, estos mismos estudios muestran que los animales deficientes en  $A_{2A}$  tienen una disminuida función pulmonar, la cual se manifiesta por una disminución en la tensión arterial de oxígeno, lo cual evidentemente muestra la importancia funcional de este receptor en el pulmón. Al profundizar más el rol de este receptor en células endoteliales pulmonares, se conoce que estos receptores están presentes en dichas células, y que presentan una forma particular de control de su expresión en situaciones de estrés como hipoxia (Ahmad et al., 2009). Así, Ahmad y colaboradores mostraron que CGS-21680 incremento la proliferación y la formación de tubos de células endoteliales microvasculares del pulmón humano (HLMVEC). Además, mostraron que hipoxia, vía activación del factor inducido por hipoxia tipo 2 alfa ( $HIF-2\alpha$ ), pero no por el tipo 1 alfa ( $HIF-1\alpha$ ), controlan la expresión del receptor  $A_{2A}$  en HLMVEC. En el contexto patológico, estos autores muestran además que la presencia de  $A_{2A}$  se correlaciona con los niveles de CD31 (marcador endotelial) en tumores pulmonares, sugiriendo que este receptor estaría asociado a una respuesta proangiogénica en pacientes con cáncer pulmonar.

Considerando estos previos estudios, los resultados en esta tesis muestran la expresión de mRNA de todos los receptores de adenosina en células endoteliales de ratón (excluyendo el  $A_{2A}$  en el ratón deficiente). Además, se encontró diferencias significativas inter género en donde las hembras  $A_{2A}AR-KO$  mostraron elevación en el mRNA para  $A_{2B}$  y  $A_3$  en cambio en machos  $A_{2A}AR-KO$  únicamente se encontró la elevación del mRNA para

A<sub>1</sub>. Estos datos indicarían que presumiblemente producto de la deficiencia de A<sub>2A</sub> tanto para hembras como macho, se generaría un aumento compensatorio de otros receptores; la cual a su vez sería distinta según el género. En este contexto, se encontraron patrones similares en la cantidad de mRNA provenientes de la nefrona entre ratones machos y hembras (Vitzthum et al., 2004). Además, otro estudio mostró en cerebro de ratas ooforectomizadas (extirpación de los ovarios), una disminución significativa de todos los receptores de adenosina, a excepción del receptor A<sub>2B</sub>, respecto a ratonas no operadas (Rose-Meyer et al., 2003). Sugiriendo entonces que la expresión de receptores de adenosina estaría controlada por la presencia de estrógenos.

La angiogénesis está relacionada a procesos de proliferación, migración y formación de tubos celulares, donde las células endoteliales tienen la capacidad de responder a factores que inhiban o estimulen la formación y desarrollo de vasos sanguíneos (Moulton et al., 1999). Múltiples estudios muestran que la estimulación de receptores de adenosina, y en particular A<sub>2A</sub>, incrementan la proliferación y migración de células endoteliales (Grant et al., 2001, Escudero et al., 2014). Nuestros resultados confirman estos hallazgos, sin embargo, se hace un alcance en cuanto a la respuesta que presentan los machos y hembras A<sub>2A</sub>AR-KO. Así, las hembras A<sub>2A</sub>AR-KO, pero no los machos, tienen una EC<sub>50</sub> mayor en al menos un orden de magnitud respecto al control hembra. Dado que las hembras producto de su estado reproductivo y cambios hormonales periódicos estarían expuestas a un estrés mayor, lo que desencadenaría un aumento en las concentraciones de adenosina lo cual se asociaría a regeneración vascular, como por ejemplo lo que ocurre en el endometrio. Es más, se ha demostrado que la

transfusión de sangre femenina aumenta eventos metastásicas en comparación con la sangre masculina en modelos de cáncer de páncreas en modelo de ratón de cáncer de páncreas (Benson et al., 2010). Esto en general indica que los mecanismos moleculares producidas en mujeres podrían favorecer la angiogénesis. Por consiguiente, es posible suponer que las hembras se verían más afectadas en la deficiencia de un receptor pro-angiogénico como es el  $A_{2A}$ .

La migración en células endoteliales mediada por receptores adenosina, tendría un papel activo en la homeostasis vascular, trayendo consigo una respuesta pro-angiogénica (Zhu et al., 2007). En este sentido nuestros resultados muestran un aumento en la respuesta migratoria al estimular los receptores de adenosina en células endoteliales del pulmón de ratones controles hembras y machos; un aumento que fue mucho más evidente cuando se estimuló el receptor  $A_{2A}$  con el agonista selectivo CGS-21680, lo cual sugeriría un rol más activo del receptor  $A_{2A}$  en el proceso migratorio celular.

Estudios en células endoteliales humanas de cerebro muestran una abundante expresión de enzimas encargadas del metabolismo del ATP para la síntesis de adenosina (CD39 y CD73), así como de la expresión del receptor  $A_{2A}$  (Blackburn et al., 2009). Utilizando estas mismas células, Kim y colaboradores (2015) mostraron que la estimulación del receptor  $A_{2A}$  por adenosina genera un aumento en la respuesta migratoria endotelial, lo cual se asoció a aumento de la permeabilidad vascular cerebral (Kim et al., 2015). Por otra parte, utilizando un modelo de animales deficientes en CD73 (enzima que transforma AMP a adenosina), mostraron resistencia al desarrollo de encefalitis autoinmune, un efecto que se asoció a una reducción en la migración de

linfocitos desde la circulación hacia el líquido cefalorraquídeo (Mills et al., 2008). Además, estos mismos autores reportan que el bloqueo del receptor  $A_{2A}$  inhibe también la migración de linfocito hacia el sistema nervioso central (Mills et al., 2008). Por tanto, la falta de CD73 o la inhibición de  $A_{2A}$  generaría una reducción de los linfocitos hacia el encéfalo, lo que a su vez tendría un efecto reductor del proceso inflamatorio. Estas evidencias dan luces del rol funcional que tiene el receptor  $A_{2A}$  en el proceso de migración, lo cual fue confirmado en nuestros resultados, en donde tanto ratones hembras como machos  $A_{2A}AR-KO$ , no muestran cambios significativos en la respuesta migratoria comparado a su propia condición basal.

Por otro lado, en modelo de lesión pulmonar aguda en ratón, se evidenció que el antiinflamatorio pentoxifilina (PTX) logró disminuir la migración de leucocitos-polimorfonucleares (PMN) (Konrad et., 2013); células que basalmente se encuentran elevada en esta patología (Reutershan et al., 2007). De relevancia para esta tesis, se mostró que los ratones  $A_{2A}AR-KO$  no muestran el efecto protector de PTX sobre el daño pulmonar agudo, sugiriendo que la presencia de este receptor es necesaria para la inhibición de la migración de PMN (Konrad et., 2013).

También en pulmón, pero utilizando un modelo de asma en ratones inducido por ovoalbúmina, se encontró que inosina (i.e., metabolito de la degradación de adenosina) ejerce un efecto supresor en la inflamación pulmonar, a través de la disminución de la migración en leucocitos (Caruso et al., 2005), un efecto que fue posteriormente asociado a la activación de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y  $A_3$  (Rocha Lapa et al., 2013). En conjunto

estos estudios, muestran que el receptor  $A_{2A}$  ejercería un efecto anti-inflamatorio en tejido pulmonar, inhibiendo la migración de leucocitos.

En el contexto de la presente tesis, nuestros resultados *in vitro* incluyen endotelio pulmonar, y además el modelo *in vivo* de cicatrización, la cual a su vez es por sí mismo un proceso inflamatorio. En este sentido, nuestros resultados *in vivo* en cicatrización muestran que ratones machos  $A_{2A}AR-KO$  evidencian un proceso más lento de cicatrización respecto a sus controles, presumiblemente asociado a una disminución en la capacidad angiogénica. Sin embargo, no medimos la interacción entre endotelio y leucocitos, lo cual podría ser una de las proyecciones de la presente tesis.

Finalmente, no hemos encontrado información sobre el proceso migratorio endotelial asociado al género. Por lo cual, nuestro estudio aporta a la literatura general en este ámbito.

Nuestros resultados muestran también que CGS-21680 aumenta en forma significativa el número de redes u/o uniones celulares, sugiriendo entonces que el receptor  $A_{2A}$  tendría un papel activo en diferenciación endotelial durante la formación de vasos sanguíneos. Estos resultados han sido previamente mostrados por otros autores (Grant et al., 2001) y confirman el rol pro-angiogénico del receptor  $A_{2A}$  en células endoteliales. Sin perjuicio de lo anterior, también se conoce que el receptor  $A_{2A}$  cumple otras funciones en la regulación de angiogénesis (ver Escudero et al., 2014). Por ejemplo, un estudio en HUVEC muestra que la estimulación con CGS-21680 en dosis dependiente, suprime la expresión de la proteína anti-angiogénica trombopondina 1 (TSP1) y su RNA mensajero, dando como respuesta un incremento en la formación de tubos vasculares



(Desai et al., 2005). Mientras que por otro lado la inhibición con el antagonista selectivo del receptor  $A_{2A}$ , ZM-241385, revirtió el efecto supresor de CGS-21680 sobre la expresión de la proteína TSP1 (Desai et al., 2005). En este escenario el receptor  $A_{2A}$  promueve la angiogénesis desregulando la expresión de TSP1 conllevando a una mayor formación de tubos.

En nuestros resultados la estimulación con CGS-21680 en células endoteliales del pulmón de macho y hembra  $A_{2A}AR-KO$  no tuvo respuesta en el número de redes y/o uniones celulares (o migración celular) respecto a su propia condición. Lo cual muestra que la respuesta angiogénica estaría mediada mayormente por receptor  $A_{2A}$ . Sin embargo, hay diferencia en cuanto al sexo. Siguiendo esta línea, nuestros resultados en células endoteliales de pulmón y estimuladas con NECA, mostraron un aumento significativo en el número de redes vasculares en hembras y machos control. Mientras que solo las hembras  $A_{2A}AR-KO$  respondieron a NECA aumentando el número de uniones tubulares. En este sentido existiría una respuesta diferencial tanto en machos como en hembras  $A_{2A}AR-KO$ , donde estas últimas tendrían una mejor respuesta pro-angiogénica.

El mecanismo por el cual las hembras  $A_{2A}AR-KO$  tendrían esta ventaja, o los machos una desventaja, respecto a sus homónimos control, no fue establecido en esta tesis. Sin embargo, es posible realizar algunas hipótesis. Por ejemplo, es posible que esta ventaja pro-angiogénica en hembras  $A_{2A}AR-KO$  estaría asociada a factores hormonales característicos de la fisiología reproductiva (ciclo reproductivo) (Losordo et al., 2000) donde particularmente los estrógenos tienen un rol modulador en la angiogénesis a nivel uterino dando como respuesta la revascularización cíclica del endometrio (Losordo et al.,

2000). Además, se ha mostrado también que la falta de estrógenos, generado experimentalmente mediante extirpación de los ovarios, se asocia a reducción de la expresión de todos los receptores de adenosina excepto el receptor  $A_{2B}$ . Por consiguiente, es posible suponer que la falta de estrógenos, en los machos, podría generar una respuesta compensatoria diferencial respecto a las hembras. De hecho, si analizamos los resultados de la expresión de receptores de adenosina en endotelio pulmonar de ratones  $A_{2A}$ AR-KO mostrado en esta tesis, se puede apreciar justamente una expresión (i.e., niveles de mRNA) diferencial de los mismos, en donde las hembras presentan elevación de dos de ellos  $A_{2B}$  y  $A_3$ , mientras que los machos únicamente del  $A_1$ . Los mecanismos de esta expresión diferencial en este tipo de endotelio no fueron abordados en esta tesis, pero resultan muy atractivos para posteriores investigaciones.

Otra posible explicación es que justamente esta expresión diferencial de receptores de adenosina, determine una eventual de adaptación ante la falta de uno de los receptores en este caso el  $A_{2A}$  en el ratón  $A_{2A}$ AR-KO. En este sentido, se conoce que prácticamente todos los receptores de adenosina participan en el proceso de angiogénesis (ver Escudero et al., 2014). Sin embargo, se conoce también que estos receptores presentan características funcionales disimiles, como por ejemplo su afinidad por NECA, siendo los receptores  $A_1$ ,  $A_{2A}$  y  $A_3$  (14 a 25 nM) más afines que  $A_{2B}$  (140 nM) en al menos un orden de magnitud (Jacobson & Gao, 1995). En este escenario, los resultados mostrados en la tesis indican que las hembras  $A_{2A}$ AR-KO tendrían mayores niveles de mRNA para el  $A_{2B}$  y  $A_3$ ; mientras que los machos para el  $A_1$ . Considerando, lo anteriormente indicado, es posible que NECA en la dosis utilizada (10  $\mu$ M) este

estimulando todos los receptores de adenosina presentes en las células endoteliales del pulmón. Por otra parte, ensayos en anillos aórticos de rata adherido a matriz de colágeno y coincubada con el agonista selectivo del receptor  $A_1$  (CPA), no mostraron respuesta en la formación de redes vasculares respecto a su control, mientras que la coincubación con el agonista no selectivo de adenosina NECA aumento significativamente el número de redes vasculares (Clark et al., 2007).

Pese a lo discutido anteriormente y dado que nuestros resultados muestran únicamente mRNA, no se descarta que exista una actividad preferencial de alguno de ellos, considerando la naturaleza dinámica de la expresión de la proteína o de la presencia a nivel de la membrana celular. O más complejo aun, considerando su capacidad de estimular ( $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ ) o inhibir ( $A_1$  y  $A_3$ ) la adenilato ciclaca, y con ello desencadenar vías de señalización diferentes. Por consiguiente, es necesario en estudios posteriores profundizar e individualizar la activación de cada uno de estos receptores, para entender de mejor forma la respuesta adaptativa diferencial entre machos y hembras  $A_{2A}AR-KO$ .

Otra posibilidad es que los receptores de adenosina tengan un dialogo con los receptores de estrógenos (hembras) o de andrógenos (machos). En este sentido, se conoce que adenosina puede coadyuvar a la estimulación del receptor de estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ). Asi, se ha mostrado que la estimulación  $ER\alpha$  mediada por el receptor  $A_1$  de adenosina aumenta la proliferación y migración en células de cáncer de mama MCF-7 (Lin et al., 2010) aumentando la respuesta angiogénica. Además, se ha mostrado que la utilización del antagonista del receptor  $A_1$  DPCPX, revierte la respuesta angiogénica (Lin et al., 2010) sugiriendo el rol activo del receptor de adenosina  $A_1$  en la regulación del  $ER\alpha$ . En

esta misma línea, estudios muestran que la estimulación del receptor  $A_{2A}$  de adenosina con CGS-21680, estimula la transcripción del receptor de progesterona y que este a su vez induce aumento en la proliferación, migración en células de cáncer de mama MCF-7 vía señalización AMPc/PKA (Etiquete et al., 2009). En conjunto se ha evidenciado que la hormona sexual estrógeno se asocia a receptor  $A_1$  y  $A_{2A}$  de adenosina, desencadenando una respuesta pro-angiogénica.

De lo expuesto hasta aquí, hay que resaltar que múltiples evidencias señalan que los receptores de adenosina  $A_{2A}$  cumplen un rol pro-angiogénico al estimular la proliferación, migración, y diferenciación endotelial (i.e., formación de tubos). Por consiguiente, la ausencia de estos receptores afectaría dichos procesos. Nuestros resultados confirman dicha hipótesis; pero se añade además que esta afectación dependería del sexo. Así, por ejemplo, los ratones  $A_{2A}AR-KO$  hembras, a diferencia de los machos  $A_{2A}AR-KO$ , requerirían una mayor dosis de NECA para generar una similar respuesta proliferativa, sin cambios importantes en la migración celular, aunque mantendrían la capacidad de formación de estructuras tubulares en respuesta a este agonista. Todo esto al parecer da una ventaja a las hembras desde el punto de vista de angiogénesis que podría también evidenciarse en los ensayos in vivo (ver más abajo).

### **5.3 Caracterización funcional de angiogénesis in vivo según sexo.**

Los resultados de ensayos in-vitro descritos previamente evidencian una respuesta angiogénica diferencial mediada por el receptor  $A_{2A}$  relacionada con el sexo del animal  $A_{2A}AR-KO$ , particularmente revelando una ventaja pro-angiogénica en hembras respecto a

los machos. Frente a este escenario suponemos que la utilización de un modelo *in vivo* de angiogénesis en ratones  $A_{2A}AR$ -KO nos dará indicio si la respuesta dada en ensayos celulares, podrá verse replicada en el organismo completo. En este sentido ensayos de cicatrización de piel reportan que ratones  $A_{2A}AR$ -KO forman un número menor de microvasos sanguíneos en respuesta a un trauma mecánico (Montesinos et al., 2000). Más aun la aplicación tópica del agonista selectivo CGS-21680 a las heridas en ratones, aumenta la formación de microvasos sanguíneos a través del aumento de la migración de células endoteliales respecto a sus respectivos controles (Montesinos et al., 2004). En apoyo a esto, nuestros resultados muestran que en ratones machos  $A_{2A}AR$ -KO al día diez de cicatrización, tienen significativamente menor cierre de la herida respecto a su control. Por consiguiente, nuestros resultados proporcionan evidencia adicional de que  $A_{2A}AR$  promovería la angiogénesis y vasculogénesis *in vivo*. Sin embargo, también hacen un alcance en la investigación ya que también se encontró que las hembras  $A_{2A}AR$ -KO se comportan en forma similar a los controles en la cicatrización de las heridas; sugiriendo que las ventajas observadas *in vitro*, podrían complementarse con observaciones *in vivo*.

En esta línea se confirmó que la estimulación con el agonista selectivo CGS-21680 promovería la recuperación de heridas en ratones controles, pero no en aquellos  $A_{2A}AR$ -KO (Víctor-Vega et al., 2002 y Montesinos et al., 1997). Además, en estos estudios, hubo un marcado aumento en el número de vasos sanguíneos en las heridas de ratones control tratados con CGS-21680 en comparación con los controles no tratados con el agonista. Otros autores han informado que en células endoteliales de ratón el receptor  $A_{2A}$  suprime la producción del anti-angiogénico trombospondina 1 (TSP1) aumentando la migración y

formación de tubos. Además, en este estudio ratones  $A_{2A}$ A-KO evidenciaron aumento de la expresión de la proteína (TSP1) (Dessai et al.,2005), el cual existiría un rol inhibitorio de agentes antiangiogénicos por parte del receptor  $A_{2A}$

Por otro lado, es necesario enfatizar que funcionalmente la dermis jugaría un rol importante al sintetizar moléculas encargadas de la regeneración cutánea (como colágeno), mientras que estructuralmente su alta vascularización, le permite ser la fuente natural de vasos sanguíneos para los procesos angiogénicos frente a traumas o remodelación vascular. Estudios histológicos en ratones  $A_{2A}$ AR-KO han evidenciado un desorden en el ordenamiento en tejido granular en heridas de ratones, comparadas con controles (Víctor-Vega et al., 2002). En este sentido se deduce que el ordenamiento homogéneo de tejido granular estaría asociado a una mejor remodelación vascular (Sun et al.,1999). Más aun en este reordenamiento estarían participando células inflamatorias (linfocitos), fibroblastos y celulares endoteliales del cual  $A_{2A}$ AR modularía su actividad angiogénica (Sun et al., 1999). En este sentido estudios muestran que la activación del receptor  $A_{2A}$  aumenta los niveles citoplasmáticos de cAMP estimulando la síntesis de colágeno I en fibroblastos humanos (Perez-Aso et al.,2014), dando como resultado aumento fibras proteicas de colágeno que forman redes de andamiajes durante la remodelación vascular (Lazzerine et al., 2012).

Nuestros resultados en histología cutánea confirman también estas evidencias, dado que encontramos que los ratones  $A_{2A}$ AR-KO, preferencialmente los machos, control poseen una menor longitud de la dermis respecto a los ratones control. Dado que la dermis juega un rol importante en el proceso de vascularización, es posible que esta

desorganización en la piel contribuya también en la disminución de la cicatrización de ratones macho  $A_{2A}AR-KO$ . Además, dado esta diferencia estructural de la dermis entre machos y hembras  $A_{2A}AR-KO$ , es necesario investigar cómo la deficiencia de este receptor impacta en el ordenamiento de la dermis, la función de fibroblastos, y la síntesis de matriz de colágeno por las mismas células tisulares, lo que finalmente impactara en los procesos de angiogénesis (Bates et al., 2003). En concreto se evidencia que estructuralmente a nivel de dermis las hembras  $A_{2A}AR-KO$  tienen una mejor estructura que los machos  $A_{2A}AR-KO$ , lo que, sumado a lo observado *in vitro*, podría explicar al menos en parte la mejor respuesta angiogénica en hembras frente a machos  $A_{2A}AR-KO$ .

En lo que respecta al flujo sanguíneo es importante conocer como es el comportamiento en el movimiento de la sangre a nivel vascular con el fin de lograr abastecimiento homogéneo a nivel de tejido. En este sentido estudios evidencian que en cerebros de ratones neonatos  $A_{2A}AR-KO$ , el daño isquémico cerebral inducido experimentalmente mediante electrocoagulación de la carótida común es mayor que los respectivos controles, sin cambios significativos en el flujo sanguíneo cerebral a los 40 minutos post isquemia medidos por Lasser Doppler (Aden et al., 2002). Con estas evidencias los autores concluyen que el receptor  $A_{2A}$  jugaría un importante rol protección en ratones jóvenes que evidencien daño isquémico cerebral (Stroke et al., 2003). Respecto a esto, nuestros resultados muestran un aumento en la perfusión sanguínea en ratones  $A_{2A}AR-KO$  respecto a sus controles, en aquellas heridas a nivel pliegue cutáneo, adicionalmente solo en machos  $A_{2A}AR-KO$  se evidencio un flujo sanguíneo turbulento e irregular. Esto presumiblemente tendería a interpretarse a que aún los lechos vasculares

se encuentran en formación o inmaduros y que estaría relacionado a una menor respuesta angiogénica mediada por el receptor  $A_{2A}$ . Si bien este último punto aún no tiene una arista definida, dado que es necesario realizar análisis histológicos los cuales permitirán identificar cantidad de lechos vasculares que estarían comprometidos. En el presente estudio, solo podría hacerse una aproximación mencionando que las hembras al tener un flujo más constante, presumiblemente lograron formar lechos vasculares tipo capilar en forma más rápida que los machos. Sin embargo, estamos conscientes de que aún faltan más estudios para comprender estos fenómenos.

Sin perjuicio de lo último, evidencias en mujeres muestran que ellas tendrían un mejor pronóstico que los hombres frente a un infarto al miocardio, vía la generación de un aumento en la densidad capilar cardiaca (Chen et al., 2001). En esto último estaría involucrado una “programación genética” en mujeres, que se sustentaría por procesos angiogénico adaptativos más eficientes frente a cuadros de estrés o patologías. En este sentido otros resultados muestran que las hembras deficientes experimentalmente de estrógenos, tendrían una pobre recuperación del flujo sanguíneo, lo que significaría una menor capacidad angiogénica respecto a las hembras no deficientes en estrógenos (Peng et al., 2011). Por tanto, tanto estudios *in vitro* (como se discutió anteriormente) como *in vivo* indicarían que la exposición a andrógenos aumentaría la capacidad de angiogénica (Sieveking et al., 2010).

En conclusión, los resultados de este estudio indican que la condición genotípica de deficiencia del receptor  $A_{2A}$  de adenosina genera una adaptación pro angiogénica tanto en hembras como en machos, dándoles una ventaja a las hembras respecto a los machos,



tanto en ensayos *in vitro* (migración y diferenciación endotelial (tubos) como la respuesta *in vivo* (cicatrización y flujo sanguíneo). Estos estudios además dan luces que existe una interacción entre estrógenos y receptores de adenosina que es necesario abordar en futuros estudios.

## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Abbracchio MP.**, Camurri A, Ceruti S, Cattabeni F, Falzano L, Giammarioli AM, Jacobson KA, Trincavelli L, Martini C, Malorni W, Fiorentini C. (2001). The A3 adenosine receptor induces cytoskeleton rearrangement in human astrocytoma cells via a specific action on Rho proteins. *Ann NY Acad Sci* 939:63–73.

**Adén U.**, Halldner, L; Lagercrantz, H; Dalmau, I; Ledent, C; Fredholm. (2003). Aggravated Brain Damage After Hypoxic Ischemia in Immature Adenosine A2A Knockout Mice. *Stroke*. 2003; 34:739-744.

**Ahmad R.**, Ahmed S, Khan NU, Hasnain (2009). *A. Operculina turpethum* attenuates N-nitrosodimethylamine induced toxic liver injury and clastogenicity in rats. *Chem Biol Interact*; 181:145–5.

**Alagappan VK.**, de Boer, WI; Misra, VK (2013). Angiogenesis and vascular remodeling in chronic airway disease. *Cell Biochem Biophys* 67(2):219-234.

**Antonioli L.**, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G (2013). Immunity, inflammation and cancer: a leading role for Ado. *Nature Reviews Cancer*; 13:842-857.

**Armstrong JM.**, Chen JF, Schwarzschild MA, Apasov S, Smith PT, Caldwell C, Chen P, Figler H, Sullivan G, Fink S, Linden J, Sitkovsky M. (2001). Gene dose effect reveals no Gs-coupled A2A adenosine receptor reserve in murine T-lymphocytes: Studies of cells from A2A-receptor-gene-deficient mice. *Biochem J* 354(Pt. 1): 123–130.

**Atkinson MR.**, Townsend-Nicholson A, Nicholl JK, Sutherland GR, Schofield PR. (1997). Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A3 receptor (ADORA3) gene.

**Badimón L.**, Martínez – González J. (2002). Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev Esp Cardiol*, 55,17-26.

**Balwierczak JL.**, Sharif R, Krulan CM, Field FP, Weiss GB, Miller MJ. (1991). Comparative effects of a selective adenosine A2 receptor agonist, CGS 21680, and nitroprusside in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 196:117–123.

**Baraldi PG.**, Tabrizi MA, Gessi S, Borea PA (2008). Ado receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *Chem Rev*; 108:238-263.

**Baraldi PG.**, Zaid AN, Lampronti I, Fruttarolo F, Pavani MG, Tabrizi MA, Shryock JC, Leung E, Romagnoli R (2000). Synthesis and biological effects of a new series of 2-amino-3-benzoylthiophenes as allosteric enhancers of A1-Ado receptor. *Bioorg Med Chem Lett*; 10:1953-1957.

**Bates GP.**, Cha JH, Frey AS, Alsdorf SA, Kerner JA, Kosinski CM, Mangiarini L, Penney JB, Jr, Davies SW, Young AB. (2003). Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354:981–989.

**Bayes M.**, (2007). Gateways to clinical trials. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 29:153-173.

**Benson D.**, Kelher, Marguerite; Meng, Xianzhong; Fullerton, David (2010). Gender-Specific Transfusion Affects Tumor-Associated Neutrophil: Macrophage Ratios in Murine Pancreatic Adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 14:1560-1565.

**Blackburn MR.**, Vance CO, Morschl E, Wilson CN (2009). Adenosine receptors and inflammation. *Handb Exp Pharmacol.* :215–269. doi: 10.1007/978-3-540-89615-9.

**Burnstock G.**, (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov*;7: 575-590.

**Brunner H.**, Cockcroft, JR., Deanfield, J., Donald, A., Ferrannini, E., Halcox, J., (2005). Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertension*; 23:233–246.

**Bruce N.**, Cronstein (2006). Adenosine Receptors and Wound Healing, Revised. *TheScientificWorldJOURNAL* 6, 984-991.

**Carmeliet P.**, Ng, Y.S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V.V., Stalmans, I., Mattot, V., et al. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5, 495-502.

**Caruso C.**, Candore G, Colonna-Romano G, Lio D, Franceschi C (2005). Inflammation and life-span. *Science* 307:208–209.

**Cavalcante JL.**, Barboza J, Ananthasubramaniam K (2011). Regadenoson is a safe and well-tolerated pharmacological stress agent for myocardial perfusion imaging in post heart transplant patients. *J Nucl Cardiol*;18:628-633.

**Chen JF.**, Moratalla R, Impagnatiello F, Grandy DK, Cuellar B, Rubinstein M, Beilstein MA, Hackett E, Fink JS, Low MJ, Ongini E, Schwarzschild MA. (2001). The role of the D (2) dopamine receptor (D (2) R) in A(2A) adenosine receptor (A (2A) R)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A(2A) and D (2) receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1970–1975.

**Chen C.**, Liu T.-Z, Liu Y.-W (2007). 6-shogaol (alkanone from ginger) induces apoptotic cell death of human hepatoma p53 mutant Mahlavu subline via an oxidative stress-mediated caspase-dependent mechanism. *J Agric Food Chem.*; 55:948–54.

**Chi O.Z.**, Liu X., Weiss H.R. (2003). Effects of inhibition of neuronal nitric oxide synthase on NMDA-induced changes in cerebral blood flow and oxygen consumption. *Exp Brain Res.*

**Clark A.**, Youkey R., Liu X., Jia L., Blatt R., Day Y. J., et al. (2007). A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes. *Circ. Res.* 101 1130–1138 10.1161/CIRCRESAHA.107150110.

**Conti A.**, Monopoli A, Gamba M, Borea PA, Ongini E. (1993). Effects of selective A1 and A2 adenosine receptor agonists on cardiovascular tissues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 348:108–112.

**Cronstein BN.**, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. (1990). The adenosine/neutrophil paradox resolved: Human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. *J Clin Invest* 85:1150– 1157.

**Cronstein B.N.**, Rosenstein, E.D., Kramer, S.B., Weissmann, G., and Hirschhorn, R. (2008). Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. *J. Immunol.* **135**, 1366–1371.

**Cronstein B.N.**, Levin, R.I., Belanoff, J., Weissmann, G., and Hirschhorn, R. (1986) Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **78**, 760–770.

**Dawicki D.**, Chatterjee D, Wyche J, Rounds S. (1997). Extracellular ATP and adenosine cause apoptosis of pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol.* ;279: L733–L742.

**Deckert J.**, Nothen MM, Bryant SP, Schuffenhauer S, Schofield PR, Spurr NK, Propping P (1997). Mapping of the human adenosine A2a receptor gene: Relationship to potential schizophrenia loci on chromosome 22q and exclusion from the CATCH 22 region. *Hum Genet* 99:326–328.

**Desai A.**, Victor-Vega, C., Gadangi, S., Montesinos, M. C., Chu, C. C., and Cronstein, B. N. (2005). Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1. *Mol. Pharm.* **67**, 1406-1413.

**Ding X.**, Zhao X, Watts A (2013). G-protein-coupled receptor structure, ligand binding and activation as studied by solid-state NMR spectroscopy. *Biochem J*; 450:443-457.

**Dixon AK.**, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 118:1461–1468.

**Drury N.**, and A. Szent-Gyorgyi. (1999). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, 68(3): p. 213-37.

**Dubey RK.**, Gillespie DG, Osaka K, Suzuki F, Jackson EK. (1996). Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells. Possible role of A2b receptor. *Hypertension* 27(3 Pt. 2):786–793.

**Dubey RK.**, Gillespie DG, Shue H, Jackson EK. (2000). A2B receptors mediate antimitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35(1 Pt. 2):267–272.

**Dye JF.**, Laurence L, Leach L, Linge LC, Firth JA, Clark P (2004). Distinct patterns of in vitro angiogenic behaviour of human microvascular endothelial cells are determined by extracellular matrices. *Endothelium*; 11:151–167.

**Escudero C.**, Bertoglia P, Hernandez M, Celis C, Gonzalez M, Aguayo C, et al (2013). Impaired A2A adenosine receptor/nitric oxide/VEGF signaling pathway in fetal endothelium during late- and early-onset preeclampsia. *Purinergic Signal*. 9:215–26. doi: 10.1007/s11302-012-9341-4.

**Escudero C.**, Roberts J. M., Myatt L., Feoktistov I. (2014). Impaired adenosine-mediated angiogenesis in preeclampsia: potential implications for fetal programming. *Front. Pharmacol*. 5:134. 10.3389/fphar.2014.00134.

**Etiquete N.**, Grillier-vuissoz,I;Lecomte,J;Flament,S (2009). Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ER $\cdot$  mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncology REPORTS* 21: 977-981.

**Feoktistov I.**, Biaggioni I. (1995). Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An en prophyllinesensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest* 96:1979–1986.

**Feoktistov I.**, Biaggioni I. (1996). Role of adenosine in asthma. *Drug Dev Res* 39:333–336.

**Feoktistov I.**, Ryzhov S, Zhong H, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D, Biaggioni I (2004). Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A<sub>2B</sub> angiogenic phenotype. *Hypertension*;44:649–654.

**Firestein G.S.**, Bullough, D., Erion, M., Ugarkar, B., Browne, G., Barankiewicz, J., Gruber, H., and Mullane, K. (1993). Adenosine regulating agents: a novel approach to acute inflammation and inflammatory arthritis. *Clin. Res.* 41, 170A.

**Fredholm BB.**, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of Ado receptors. *Pharmacol. Rev;* 53:527-552.

**Fredholm BB.**, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of Ado receptors--an update. *Pharmacol Rev* 63:1-34.

**Fredholm BB.**, Proctor W, Van der Ploeg I, Dunwiddie TV. (1989). In vivo pertussis toxin treatment attenuates some, but not all, adenosine A1 effects in slices of the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 172:249–262.

**Gagliaerdi A.**, Wilshire,G (1993).Gonadotropin-releasing hormone agonist administration in early human pregnancy is associated with normal outcomes. *Fertil Stiles.* 60:980-83.

**Ge ZD.**, Peart JN, Kreckler LM, Wan TC, Jacobson MA, Gross GJ, Auchampach JA (2006). Cl-IB-MECA [2-chloro-N6-(3-iodobenzyl) Ado-5'-Nmethylcarboxamide] reduces ischemia/reperfusion injury in mice by activating the A3 Ado receptor. *J Pharmacol Exp Ther;* 319:1200-1210.

**Gerasimovskaya EV.**, Woodward, HN, Tucker, DA & Stenmark, KR (2008). Extracellular ATP is a pro-angiogenic factor for pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *Angiogenesis.*

**Gessi S.**, Merighi S, Sacchetto V, Simioni C, Borea PA (2011). Ado receptors and cancer. *Biochim Biophys Acta;* 1808:1400-1412.

**Gessi S.**, Merighi S, Stefanelli A, Fazzi D, Varani K, Borea PA (2013). A (1) and A(3) Ado receptors inhibit LPS-induced hypoxia-inducible factor-1 accumulation in murine astrocytes. *Pharmacol Res;* 76:157-170.

**Gessi S.**, Varani K, Merighi S, Ongini E, Borea PA (2000). A2A Ado receptors in human peripheral blood cells. *Br J Pharmacol;* 129:2-11.

**Gessi S.**, Merighi S, Varani K, Leung E, Mac Lennan S, Borea PA (2008). The A3 Ado receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacol Ther;* 117:123-140.

**Gessi S.**, Sacchetto V, Fogli E, Merighi S, Varani K, Baraldi PG, Tabrizi MA, Leung E, MacLennan S, Borea PA (2010). Modulation of metalloproteinase-9 in U87MG glioblastoma cells by A3 Ado receptors. *Biochem Pharmacol*; 79:1483-1495.

**Grant M.**, Davis M. I., Caballero S., Feoktistov I., Biaggioni I., Belardinelli L. (2001). Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2068–2073

**Grenz A.**, Zhang H, Eckle T, Mittelbronn M, Wehrmann M, Köhle C, Kloor D, Thompson LF, Osswald H, Eltzschig HK (2007). Protective role of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in renal ischemia. *J Am Soc Nephrol*; 18:833-845.

**Guyton A.**, & Hall, J.E. (1996). "Tratado de Fisiología médica". 9ª Edición. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid.

**Hasko G.**, Linden J, Cronstein B, Pacher P (2008). Ado receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7:759-770.

**Hasko G.**, Pacher P (2008). A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol*; 83:447-455.

**Hasko G.**, Csoka B, Nemeth ZH, Vizi ES, Pacher P (2009). A (2B) Ado receptors in immunity and inflammation. *Trends Immunol*; 30:263-270.

**Hasuo H.**, Shoji S, Gallagher JP, Akasu T. 1992. Adenosine inhibits the synaptic potentials in rat septal nucleus neurons mediated through pre- and postsynaptic A1-adenosine receptors. *Neurosci Res* 13:281–299.

**Hussain A.**, Karjian P, Maddock H (2009). The role of nitric oxide in A3 Ado receptor-mediated cardioprotection. *Auton Autacoid Pharmacol*; 29:97-104.

**Jacobson KA.**, Park KS, Jiang JL, Kim YC, Olah ME, Stiles GL, Ji XD. (1997). Pharmacological characterization of novel A3 adenosine receptor-selective antagonists. *Neuropharmacology* 36:1157–1165.

**Jacobson MA.**, Johnson RG, Luneau CJ, Salvatore CA. (1995). Cloning and chromosomal localization of the human A2b adenosine receptor gene (ADORA2B) and its pseudogene. *Genomics* 27:374–376.

**Jajoo S.**, Mukherjea D, Kumar S, Sheth S, Kaur T, Rybak LP, Ramkumar V (2010). Role of beta-arrestin1/ERK MAP kinase pathway in regulating Ado A1 receptor desensitization and recovery. *Am J Physiol Cell Physiol*;298:C56-65.

**Johns A.**, Freay, A; Fraser,W (1996).Disruption of estrogen receptorgene prevent 17 beta estradiol.induced angiogenesis in transgenic mice.Endocrinology. 137:4511-4513.

**Junqueira L.**, Bignolas, G., Brentani, RR., (1979). Picrosirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, vol. 11, no. 4, p. 447-455.

**Karjian P.**, Al-Rajaibi H, Hussain A, Maddock H (2006) Activation of A3 Ado receptors protects the ischemic reperfused myocardium via recruitment of PI3K-AKT-iNOS cell survival pathway. *Circulation*;114: II\_1204.

**Kern MJ.**, Hodgson JM, Dib N, Mittleman RS, Crane PD (2006). Effects of apadenoson, a selective Ado A2A receptor agonist for myocardial perfusion imaging, on coronary blood flow velocity in conscious patients. *Circulation*; 114:2780

**Kim-Schulze S.**, McGowan K. A., Hubchak S. C., Cid M. C., Martin M. B., Kleinman H. K., Greene G. L., Schnaper H. W (1996). Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation*. ;94: 1402-7

**Kim J.**, Loggia, M.L., Cahalan, C., Harris, R.E., Beissner, F., Garcia, R., Kim, H.J., Wasan, A.D., Edwards, R.R., Napadow, V (2015). The somatosensory link: S1 functional connectivity is altered by sustained pain and associated with clinical/autonomic dysfunction in fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatology*.

**Kyriakides TR.**, Rojnuckarin P, Reidy MA, Hankenson KD, Papayannopoulou T, Kaushansky K, Bornstein P (2003). Megakaryocytes require thrombospondin-2 for normal platelet formation and function. *Blood* 101:3915-3923.

**Kiesman WF.**, Elzein E, Zablocki J (2009). A1 Ado receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers. In: Wilson CN, Mustafa SJ, editors. *Ado receptors in health and disease, Handbook of Experimental Pharmacology*:25-58.

**Koeppe M.**, Eckle T, Eltzhig HK (2009). Selective deletion of the A1 Ado receptor abolishes heart-rate slowing effects of intravascular Ado in vivo. *PLoS One*;4: e6784.

**Konrad F.**, M Gianna Neudeck,Irene Vollmer,Kristian C. Ngamsri. (2013). Protective effects of pentoxifylline in pulmonary inflammation are adenosine receptor A2A dependen. *The FASEB Journal* article fj.13-228122.

**Lagerstrom MC.**, Schioth HB (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*; 7:339-357.

**Lazzerini PE.**, Natale M, Gianhecchi E, Capecchi PL, Montilli C, Zimbone S, Castrichini M, Balistreri E, Ricci G, Selvi E, Garcia-Gonzalez E, Galeazzi M, Laghi-Pasini F. (2012).



Adenosine A<sub>2A</sub> receptor activation stimulates collagen production in sclerodermic dermal fibroblasts either directly and through a cross-talk with the cannabinoid system. *J Mol Med*.

**Lebon G.**, Warne, T; Edwards, P; Bennett, K (2011). Agonist-bound adenosine A<sub>2A</sub> receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature*, vol 478, issue 7352.

**Ledent C.**, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A<sub>2a</sub> receptor. *Nature* 388:674–678.

**Lefkowitz RJ.**, (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*; 25:413-422.

**Le Poole IC.**, Yang F, Brown TL, Cornelius J, Babcock GF, Das PK, Boissy RE. (1999). Altered gene expression in melanocytes exposed to 4-tertiary butyl phenol (4-TBP): Upregulation of the A<sub>2b</sub> adenosine receptor 1. *J Invest Dermatol* 113:725–731.

**Lin S.**, Lin, L.Y. Yan, X.T. Zhang, J. Yuan, M. Li, J. Qiao, Z.Y. Wang, Q.Y. Sun (2010). ER- $\alpha$ 36, a variant of ER- $\alpha$ , promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways *PloS One*, 5p. e9013.

**Linden J.**, (2001). Molecular approach to Ado receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 41:775-787.

**Londos C.**, Cooper, D.M.F., and Wolff, J. (1991). Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 2551–2554.

**Lopes LV.**, Sebastiao AM, Ribeiro JA (2011). Ado and related drugs in brain diseases: present and future in clinical trials. *Curr Top Med Chem*; 11: 1087-1101.

**Losordo D.**, Hisner Losordo, D. W. y Isner, J. M. (2001). "Estrogen and angiogenesis: A review". *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 21 (1), pp. 6-12.

**Losordo D. W.**, Kearney M., Kim E. A., Jekanowski J., Isner J. M. (2000). Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*.;89:1501–10.

**Lu J.K.**, Zhang K, Nam S, Anderson R. A, Jove R, Wen W (2010). Novel angiogenesis inhibitory activity in cinnamon extract blocks VEGFR2 kinase and downstream signaling. *Carcinogenesis*.;31:481–8.

**MacCollin M.**, Peterfreund R, MacDonald M, Fink JS, Gusella J. (1994). Mapping of a human A<sub>2a</sub> adenosine receptor (ADORA2) to chromosome 22. *Genomics* 20:332–333.

**Mac-Cormack D.G.**, BARNES, P.J. & EVANS, T.W. (1989). Purinoceptors in the pulmonary circulation of the rat and their role in hypoxic vasoconstriction. *Br. J. Pharmacol.*, 98, 367 ± 372

**Marquardt DL.**, Walker LL, Heinemann S. (1994). Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 152:4508–4515.

**Megson AC.**, Dickenson JM, Townsend-Nicholson A, Hill SJ. (1995). Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 115:1415–1424.

**Meng F.**, Xie GX, Chalmers D, Morgan C, Watson SJ, Jr., Akil H. (1994). Cloning and expression of the A2a adenosine receptor from guinea pig brain. *Neurochem Res* 19:613–621.

**Mills NL.**, Tornqvist H, Robinson SD, Gonzaléz M, Darnley K, MacNee W, Boon NA, Donaldson K, Blomberg A, Sandstrom T, Newby DE. (2008)-Diesel Exhaust Inhalation Causes Vascular Dysfunction and Impaired Endogenous Fibrinolysis.

**Montesinos M.**, C., Yap Y. S., Desai A., Posadas I., McCrary C. T., Cronstein B. N. (2000). Reversal of the anti-inflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists and caffeine: evidence that the anti-inflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum.* 43 656–663.

**Montesinos M.**, Chen, J.-F., Desai, A., Yee, H., Jacobson, M., Schwarzschild, M., Fink, J., and Cronstein, B. (2002). Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A2A receptors. *Am. J. Pathol.* 160, 2000–2009.

**Montesinos M.C.**, Gadangi, P., Longaker, M., Sung, J., Levine, J., Nilsen, D., Reibman, J., Li, M., Jiang, C.K., Hirschhorn, R., Recht, P.A., Ostad, E., Levin, R.I., and Cronstein, B.N. (1997) Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G alpha s- linked) receptors. *J. Exp. Med.* 186, 1615–1620.

**Montesinos MC.**, Shaw JP, Yee H, Shamamian P, Cronstein BN. (2004). Adenosine A(2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am J Pathol*; 164:1887–1892.

**Moulton K.**, Heller E, Konerding M., Flynn E., Palinski W., Folkman J. (1999). Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 99:1726–1732.

**Mura M.**, Dos Santos C.C. Stewart D. Liu M (2004). Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury. *J. Appl. Physiol*; 97:1605–1617.

**Negro C.**, Morgado-Valle C., Feldman J. L. (2002). Respiratory rhythm: an emergent network property? *Neuron* 34, 821.10.1016/S0896-6273(02)00712-2.

**Nieman RB.**, Sharma K, Edelberg H, Caffè SE (2003). Telithromycin and myasthenia gravis. *Clin Infect Dis*; 37:15.

**Nguyen MT.**, Tran, T; Dong, T.D (2009). Intraoperative evaluation of breast tumor margins with optical coherence tomography *Cancer Research*, 69, p. 22.

**Oldham WM.**, Hamm HE (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9:60-71.

**Ohta A.**, Sitkovsky M (2001). Role of G-protein-coupled Ado receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414:916-920.

**Okusa M.D.**, Linden, J., Huang, L., Rieger, J.M., Macdonald, T.L., and Huynh, L.P. (2000) A(2A) adenosine receptor-mediated inhibition of renal injury and neutrophil adhesion. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, F809– 818.

**Orfanos S.**, Mavrommati I., Korovesi I., (2004). Roussos C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive Care Med*; 30:1702–1714.

**Peterfreund RA.**, MacCollin M, Gusella J, Fink JS. (1996). Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene. *J Neurochem* 66:362–368.

**Peng B.**, Chen X, Shen Y, Bao X. (2011). Effect of controlled overexpression of xylokinase by different promoters on xylose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Article | Research Support, Non-U.S. Gov't.*

**Perez-Aso M.**, Fernandez P, Mediero A, Chan ES, Cronstein BN (2014). Adenosine 2A receptor promotes collagen production by human fibroblasts via pathways involving cyclic AMP and AKT but independent of Smad2/3. *FASEB J* 28 802–812: 201.

**Piersen CE.**, True CD, Wells JN. (1994). A carboxyl-terminally truncated mutant and nonglycosylated A2a adenosine receptors retain ligand binding. *Mol Pharmacol* 45:861–870.

**Ralevic V.**, Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*; 50:413-492.

**Raman M.**, Chen W, Cobb MH (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*; 26:3100-3112.

**Reppert SM.**, Weaver DR, Stehle JH, Rivkees SA. (1991). Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol Endocrinol* 5:1037–1048.

**Ren H.**, Stiles GL. (1994). Characterization of the human A1 adenosine receptor gene. Evidence for alternative splicing. *J Biol Chem* 269:3104–3110.

**Reutershan J.**, Stockton R, Zarbock A, Sullivan GW, Chang D, Scott D, et al (2007). Blocking p21-activated kinase reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury by preventing polymorphonuclear leukocyte infiltration. *Am J Respir Crit Care Med*.

**Rossouw J.E.**, Anderson G. L., Prentice R. L., LaCroix A. Z., Kooperberg C., Stefanick M. L., Jackson R. D., Beresford S. A., Howard B. V., Johnson K. C., Kotchen J. M., Ockene J. 2002); Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 288:321–33.

**Rosamond, W.**, K. Flegal, et al. (2008). Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117(4): e25-146.

**Rose'Meyer M.**, Albert S. Mellick, Bronwyn G. Garnham, Glenn J. Harrison, Helen M. Massa, Lyn R. Griffiths (2003). The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. *School of Health Sciences, Griffith University, GCMC PMB 50, Gold Coast, QLD 9726, Australia*.

**Rocha Lapa F.**, Oliveira A ; Accetturi, B; Martins,I; Domingos,H; Cabrini, D . (2013). Anti-inflammatory effects of inosine in allergic lung inflammation in mice: evidence for the participation of adenosine A<sub>2A</sub> and A<sub>3</sub> receptors *Purinergic Signal*. Sep; 9(3): 325–336

**Ryzhov S.**, Solenkova, N. V., Goldstein, A. E., Lamparter, M., Fleenor, T., Young, P. P., ... Feoktistov, I. (2008). Adenosine Receptor-Mediated Adhesion of Endothelial Progenitors to Cardiac Microvascular Endothelial Cells. *Circulation Research*, 102(3), 356–363. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.158147.

**Salmon J E.**, and Cronstein, B.N. (1990). Fcγ receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy: A1 receptors are stimulatory and A2 receptors are inhibitory. *J. Immunol*. 145, 2235–2240.

**Shannon H.**, Carroll<sup>†</sup>Nathan A. Wigner Nitin Kulkarni Hillary Johnston-Cox Louis C. Gerstenfeld<sup>§</sup> and Katya Ravid (2012). A2B Adenosine Receptor Promotes Mesenchymal Stem Cell Differentiation to Osteoblasts and Bone Formation *in Vivo*. *Biol Chem* January 8, 291 (2).

**Schutte F.**, Burgdorf C, Richardt G, Kurz T (2006). Ado A1 receptor-mediated inhibition of myocardial norepinephrine release involves neither phospholipase C nor protein kinase C but does involve adenylyl cyclase. *Can J Physiol Pharmacol*; 84:573-577.

**Schnermann J.**, Briggs JP (2008). Tubule glomerular feedback: mechanistic insights from gene-manipulated mice. *Kidney Int*; 74:418-426.

**Schioth HB.**, (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*; 7:339-357.

**Shneyvays V.**, Leshem D, Zinman T, Mamedova LK, Jacobson KA, Shainberg A (2005). Role of Ado A1 and A3 receptors in regulation of cardiomyocyte homeostasis after mitochondrial respiratory chain injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;288:H2792-2801

**Sigvant B.**, Wiberg-Hedman N,K; Bergqvist, D (2007). A population-based study of peripheral arterial disease prevalence with special focus on critical limb ischemia and sex differences. *Journal of Vascular Surgery* ( 07 /2007; 45(6):1185-91.DOI: 10.1016/j.jvs.2007.02.004.

**Shibuya M.**, (2006). Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39, 469-1042 478.

**Sitkovsky MV.**, (2001) T regulatory cells: hypoxia-Adorgic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol*; 30:102-108.

**Sieveking D.**, P. Patrick Lim, Renée W.Y. Chow, Louise L. Dunn, Shisan Bao, Kristine C.Y. McGrath, Alison K. Heather, David J. Handelsman, David S. Celermajer, and Martin K.C. Ng. (2010). A sex-specific role for androgens in angiogenesis. *Journal of Experimental Medicine*; DOI: [10.1084/jem.20091924](https://doi.org/10.1084/jem.20091924).

**Solenkova NV.**, Solodushko V, Cohen MV, Downey JM (2006) Endogenous Ado protects preconditioned heart during early minutes of reperfusion by activating Akt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*;290:H441-449.

**Stehle JH.**, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. (1992). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2- adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol* 6:384–393.

**Stroke.** (2003). Recommendations on stroke prevention, diagnosis, and therapy: report of the WHO Task Force on Stroke and Other Cerebrovascular Disorders. *Stroke.*; 20: 1407–1431.

**Sun D.,** Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J (2001). Mediation of tubule glomerular feedback by Ado: evidence from mice lacking Ado 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98:9983-9988.

**Sun WC.,** Moore JN, Hurley DJ, Vandenplas ML, Linden J, Cao Z, (1999). Adenosine A2A receptor agonists inhibit lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by equine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* :91–100.

**Sun CN.,** Cheng HC, Chou JL, Lee SY, Lin YW, Lai HL, Chen HM, Chern Y (2006). Rescue of p53 blockage by the A2A Ado receptor via a novel interacting protein, translin-associated protein X. *Mol Pharmacol*;70:454-466.

**Sun LL.,** Xu, L.L., Nielsen, T.B., Rhee, P., and Burris, D. (1999). Cyclopentyladenosine improves cell proliferation, wound healing, and hair growth. *J. Surg. Res.* **87**, 14–24.

**Varani K.,** Merighi S, Gessi S, Klotz KN, Leung E, Baraldi PG, Cacciari B, Romagnoli R, Spalluto G, Borea PA. (2000). [(3) H] MRE 3008F20: A novel antagonist radioligand for the pharmacological and biochemical characterization of human A (3) adenosine receptors. *Mol Pharmacol* 57:968–975.

**Vallon V.,** Muhlbauer B, Osswald H (2006). Ado and kidney function. *Physiol Rev*; 86:901-940.

**Van Calker D.,** Muller M, Hamprecht B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33:999–1005.

**Venkov C.D.,** Rankin A. B., Vaughan D. E. (1996). Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation.* 94:727–33.

**Victor-Vega C.,** Desai, A.,Montesinos, M., and Cronstein, B. (2002). Adenosine A2A agonists promote more rapid wound healing than recombinant human platelet derived growth factor (PDGF). *Inflammation.*

**Vitzthum H.,** Weiss B, Bachleitner W, Kramer BK, Kurtz (2004). Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney Int*; 65:1180–90.

**Whorton MR.**, Jastrzebska B, Park PS, Fotiadis D, Engel A, Palczewski K, Sunahara RK (2008). Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer. *J Biol Chem*; 283:4387-4394.

**White JF.**, Grodnitzky J, Louis JM, Trinh LB, Shiloach J, Gutierrez J, Northup JK, Grisshammer RK, Grisshammer R (2007). Dimerization of the class A G protein-coupled neurotensin receptor NTS1 alters G protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104:12199-12204.

**Wilson CN.**, Batra VK. (2002). Lipopolysaccharide binds to and activates A1 adenosine receptors on human pulmonary artery endothelial cells. *J Endotoxin Res*; 8:263–271.

**Yaar R.**, Jones,M; Chen,J; Ravid,K (2005). Animal Models for the Study of Adenosine Receptor Function. *Journal of cellular physiology* 202:9–20.

**Yldiz G.**, Demiryürek AT, Gümüşel B, Lipton H (2007). Ischemic preconditioning modulates ischemia-reperfusion injury in the rat lung: role of Ado receptors. *Eur J Pharmacol*; 556:144-150.

**Zcharia E.**,Zilka R ;Yaar A ;YacobyZeevi O ;Zetser A ;Metzger S ;Sarid R;;Naggi A ;Casu B, Ilan N, ; Vlodaysky I, ; Abramovitch R (2005). Heparanase accelerateswound angiogenesis and wound healing in mouse and rat models. *FASEB J*19:211–21.

**Zhou X.**, Kost CK (2006). Ado A1 receptor antagonist blunts urinary potassium excretion, but not renal hemodynamic effects, induced by carbonic anhydrase inhibitor in rats. *J Pharmacol Exp Ther*; 316:530-538.

**Zhu CQ.**, Popova SN, Brown ER, Barsyte-Lovejoy D, Navab R, Shih W, Li M, Lu M, Jurisica J, Penn LZ, et al (2007). Integrin  $\alpha$ 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 104: 11754–1175.





## 7 Tablas

**Tabla 1:** Secuencia de los partidores y tamaño esperado del producto de PCR para los genes sujetos a estudio.

GEN	Secuencia Oligonucleótidos	Tamaño Pb
A <sub>1</sub> R	F 5'' CGG-GAT-CCT-ACA-TCT-CGG-CCT-TCC-AGG-3'' R 5'' GGA-ATT-CAG-TAG-GTC-TGT-GGC-CA-ATG-3''	219
A <sub>2A</sub> R	F 5'' AGC-CAG-GGG-TTA-CAT-CTG-TG-3'' R 5'' AGA-CAA-TCG-GCT-GCT-CTG-AT-3''	177
A <sub>2B</sub> R	F 5''-CGG-GAT-CCT-TTC-ACG-GCT-GCC-TCT-TC-3'' R 5''-GGA-ATT-CCA-TCC-CCC-AGT-TCT-GTC-C-3''	256
A <sub>3</sub> R	F 5'' CGG-GAT-CCC-GTT-CCG-TGG-TCA-GTT-TG-3'' R 5'' GGA-ATT-CGC-AGG-CGT-AGA-CAA-TAG-G-3''	348
NEO	F 5'' AGA-CAA-TCG-GCT-GCT-CTG-AT-3'' R 5'' CAA-GCT-CTT-CAG-CAA-TAT-CAC-G 3''	618
mLP37	F 5'' TCT-TCC-GGT-CTC-TTT-GGC-CT R 3'' CTT-GGG-TTT-CGG-CGT-TGT-TC-5''	297
JARID	F 5' CTG-AAG-CTT-TTG-GCT-TTG-AG-3'' R 5' CCA-CTG-CCA-AAT-TCT-TTG-G-3	331

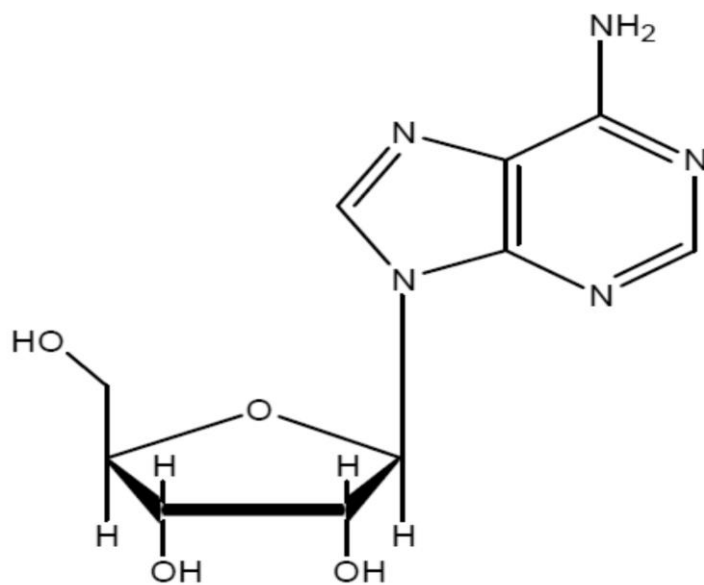
**Tabla 2.** Valores de LogEC<sub>50</sub> para proliferación celular en respuesta al agonista no selectivo NECA

	WT	A <sub>2A</sub> AR-KO
Hembras	10 <sup>-6.4</sup> (10 <sup>-6.7</sup> a 10 <sup>-6.0</sup> M)	10 <sup>-5.4</sup> (10 <sup>-5.9</sup> a 10 <sup>-5.0</sup> M)*
Machos	10 <sup>-5.5</sup> (10 <sup>-6.1</sup> a 10 <sup>-4.9</sup> M)*	10 <sup>-5.3</sup> (10 <sup>-6.1</sup> a 10 <sup>-4.6</sup> M)*

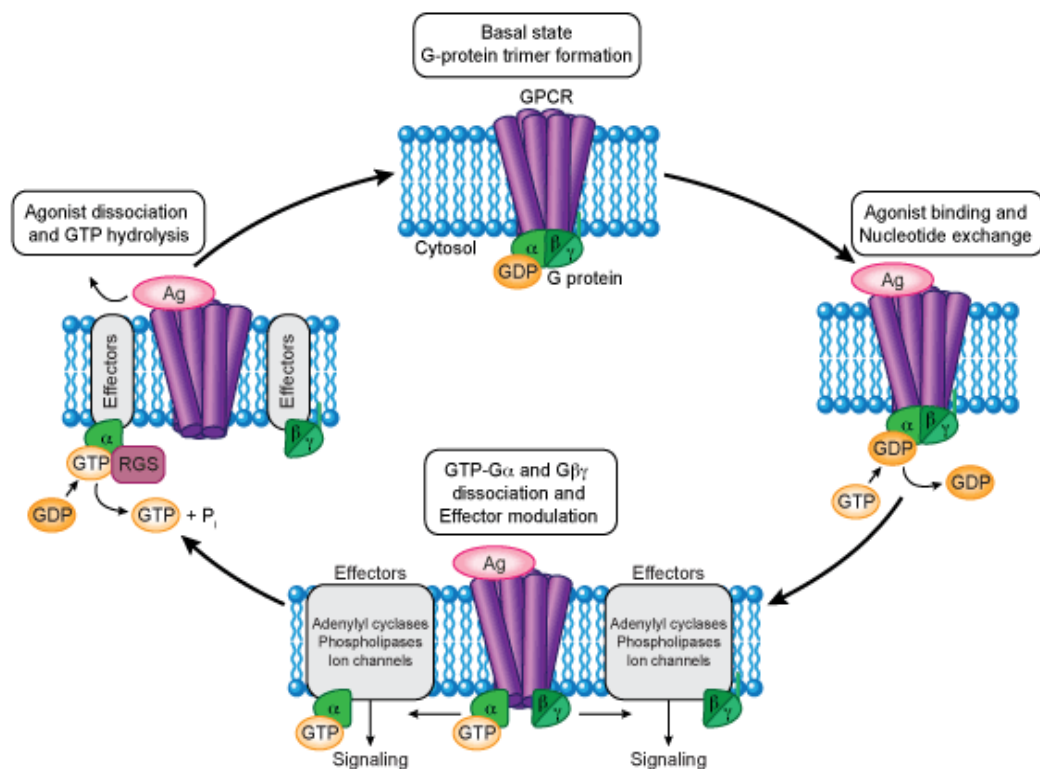
WT, ratón silvestre control. A<sub>2A</sub>AR-KO, ratón deficiente en receptor A<sub>2A</sub> de adenosina.

\*P<0.05 vs hembras WT. En paréntesis 95%IC

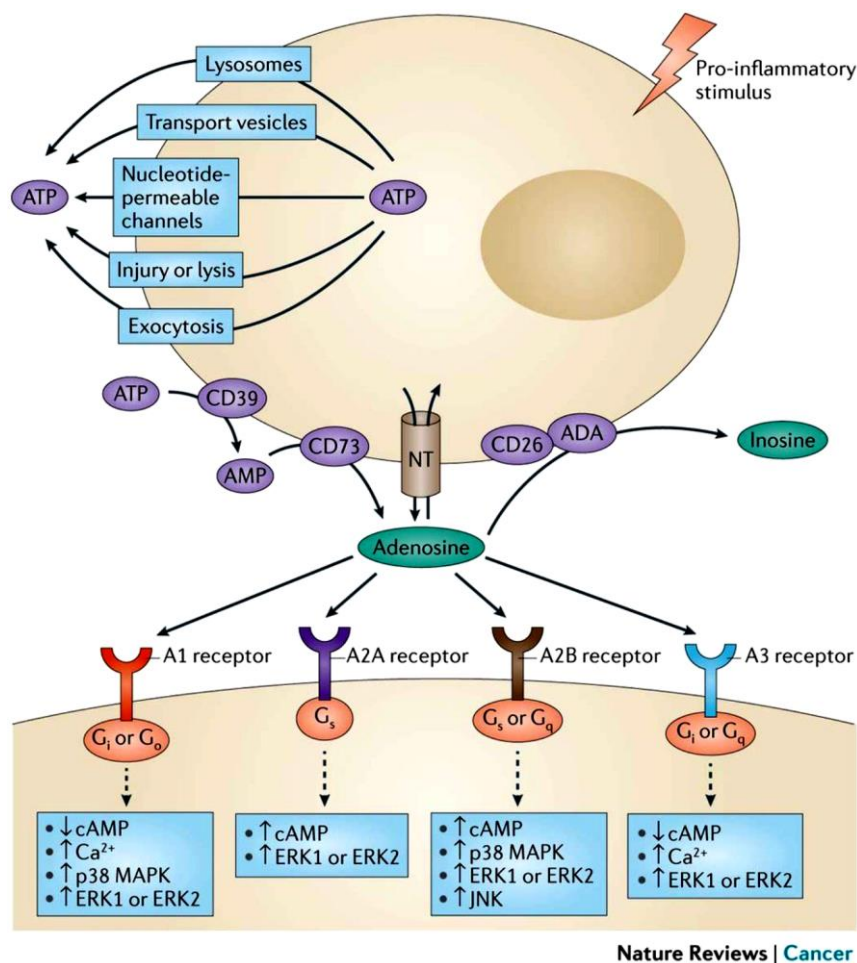
## 8. Figuras



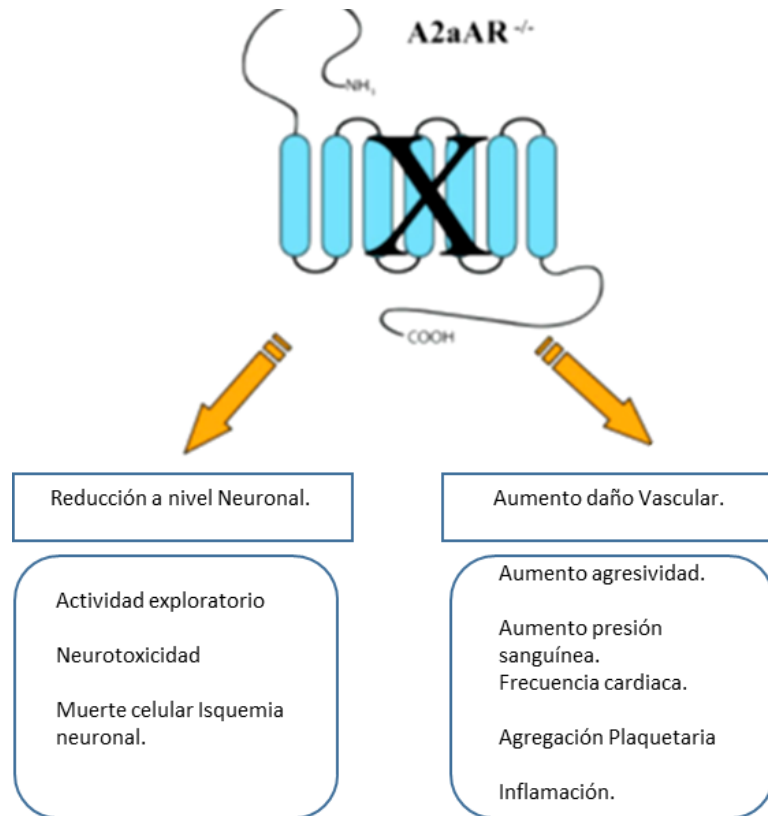
**Figura 1:** Estructura química adenosina (ADO) en la que se muestra la ribosa unida a la base nitrogenada adenina.



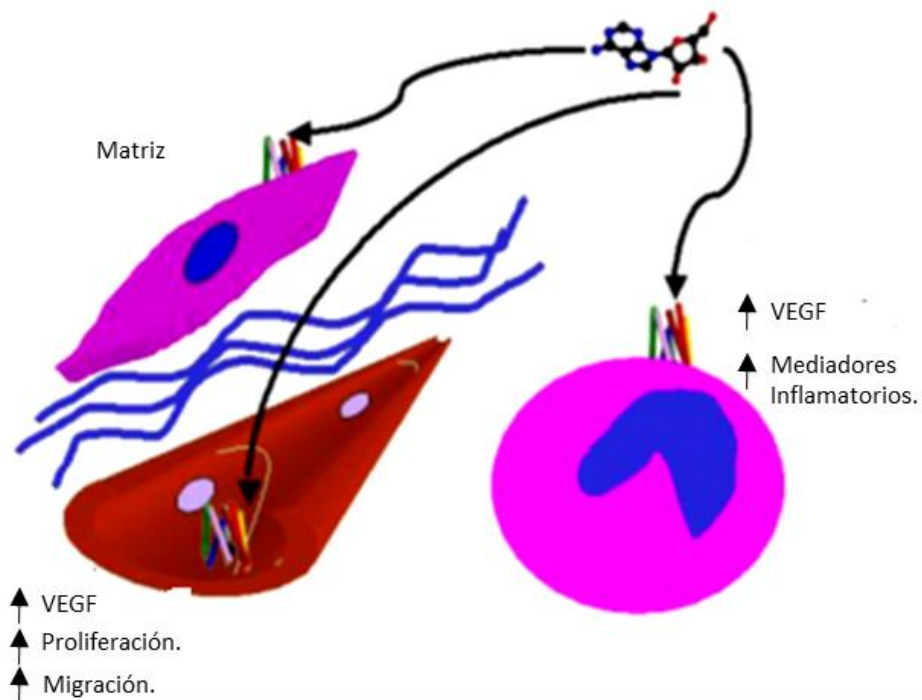
**Figura 2 Receptor acoplado a proteínas G.** La figura muestra un resumen de los acontecimientos evidenciados en el ciclo de activación de los receptores acoplados a proteína G, al cual pertenecen la familia de receptores de adenosina (Whorton et al., 2008; Fredholm et al., 2011). En breve, los receptores se encuentran en un estado de reposo inicialmente, que en presencia del agonista (Ag) es activado, lo cual lleva a la activación de proteínas G, mediante cambio del guanosin difosfato (GDP) por guanosin tri-fosfato (GTP), lo que a su provoca la separación de la fracción alfa ( $\alpha$ ) de las otras fracciones ( $\beta$ ,  $\gamma$ ). El receptor unido a la fracción de proteína  $G\alpha$  activa una cascada de señalización a través de activación de otras proteínas (Efectores, adenilato ciclasa, canales iónicos, entre otros) (White et al., 2007). Luego de ello, la GTP es metabolizada a GDP y con ello se pierde la unión de proteína  $G\alpha$  al receptor, volviendo a un estado basal. Figura tomada de Whorton et al., 2008.



**Figura 3: Síntesis y activación de los receptores de adenosina.** En determinadas condiciones de estrés celular (como hipoxia o estímulos pro-inflamatorios) las células liberan adenosin tri-fosfato (ATP) hacia el medio extracelular por una serie de mecanismos que incluyen lisosomas, exosomas, transportadores o lesión de la pared celular. En estas circunstancias ATP es metabolizado a adenosina vía una cadena de reacciones enzimáticas en las que intervienen CD39 y CD73. La adenosina formada en el extracelular puede ser a su vez regulada por una serie de mecanismos incluyendo transporte hacia dentro o fuera de la célula via transportadores de nucleosidos (NT) o de enzimas que la degradan como CD78 o adenosina deaminasa (ADA) hasta inosina. Eventualmente, adenosina puede activar receptores de membrana en la célula blanco conocidos como A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>, desencadenando una serie de señalizaciones intracelulares. Figura tomada de Antonioli et al., 2013.



**Figura 4: Consecuencia a nivel neuronal y cardiovascular producto de una deficiencia del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> en ratones.** La disfuncionalidad del receptor A<sub>2A</sub> induce daño a nivel neuronal provocando una pobre actividad exploratoria en el ratón llevando neurotoxicidad producto de muerte neuronal. Por otra parte, a nivel vascular ratones A<sub>2A</sub>AKO son propensos a aumento de presión arterial agregación plaquetaria e inflamación (Bruce.,2006).

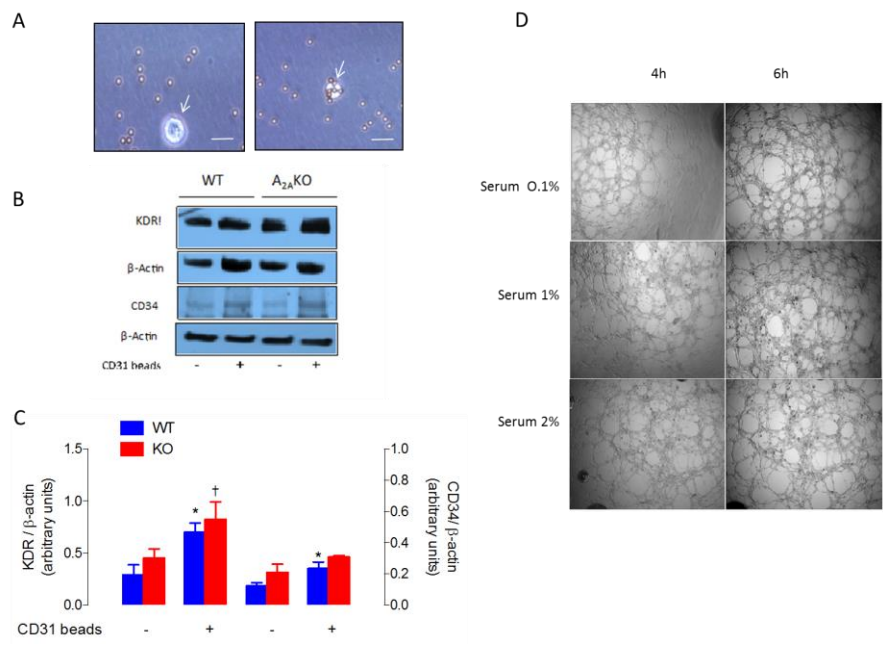


**Figura 5:** Estimulador receptor de adenosina induce aumento de factores pro-angiogénicos. La estimulación del receptor A<sub>2A</sub> en células promueve la angiogénesis, mediada por factores pro-angiogénicos (VEGF), lo que a su vez produce una mejor remodelación vascular. (Yaar et al., 2005).

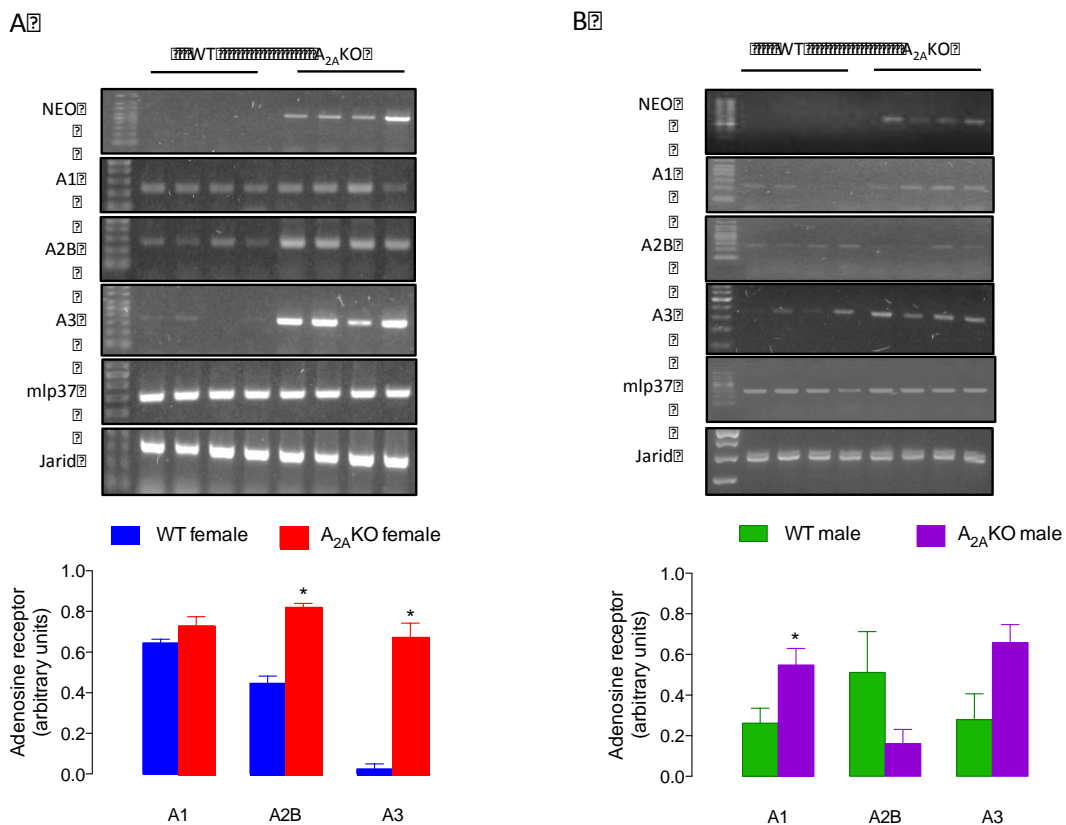


**Figura 6:** Representación de lesión cutánea nivel dorsal. Ensayo de cicatrización de herida *in-vivo* realizada en ratón rasurado a nivel dorsal. Esta técnica permite realizar seguimiento de evolución de la herida en el tiempo. Figura tomada de Zcharia et al., 2005.

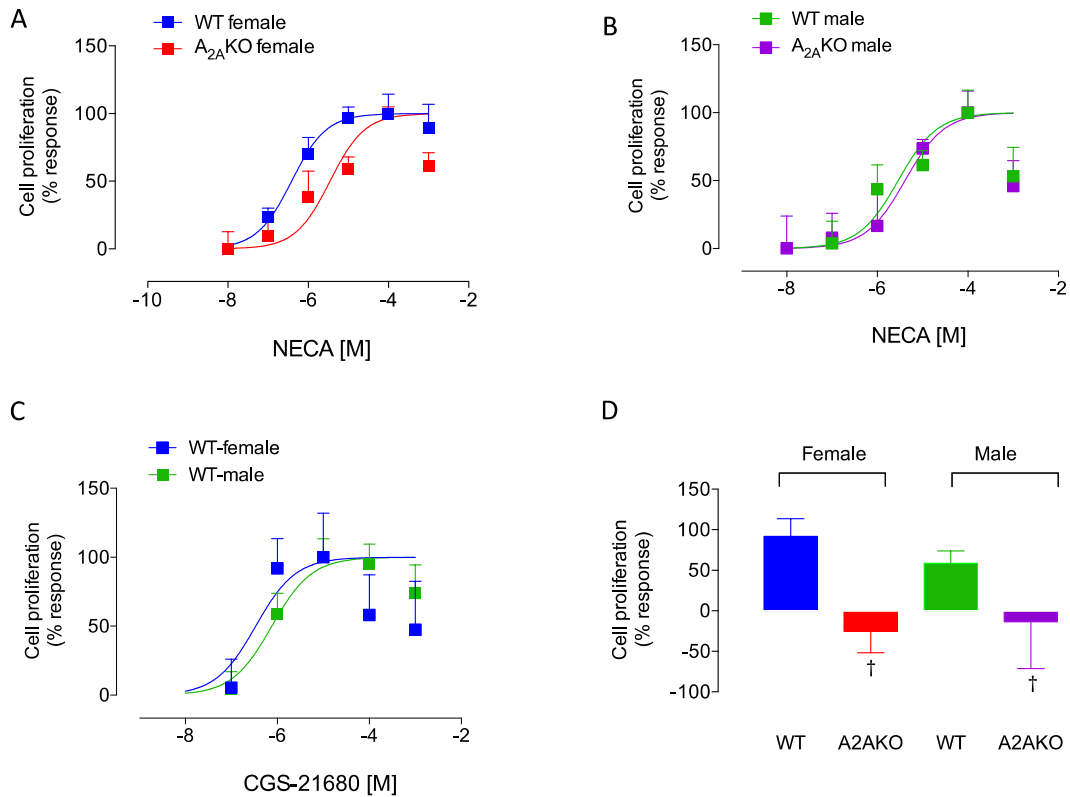




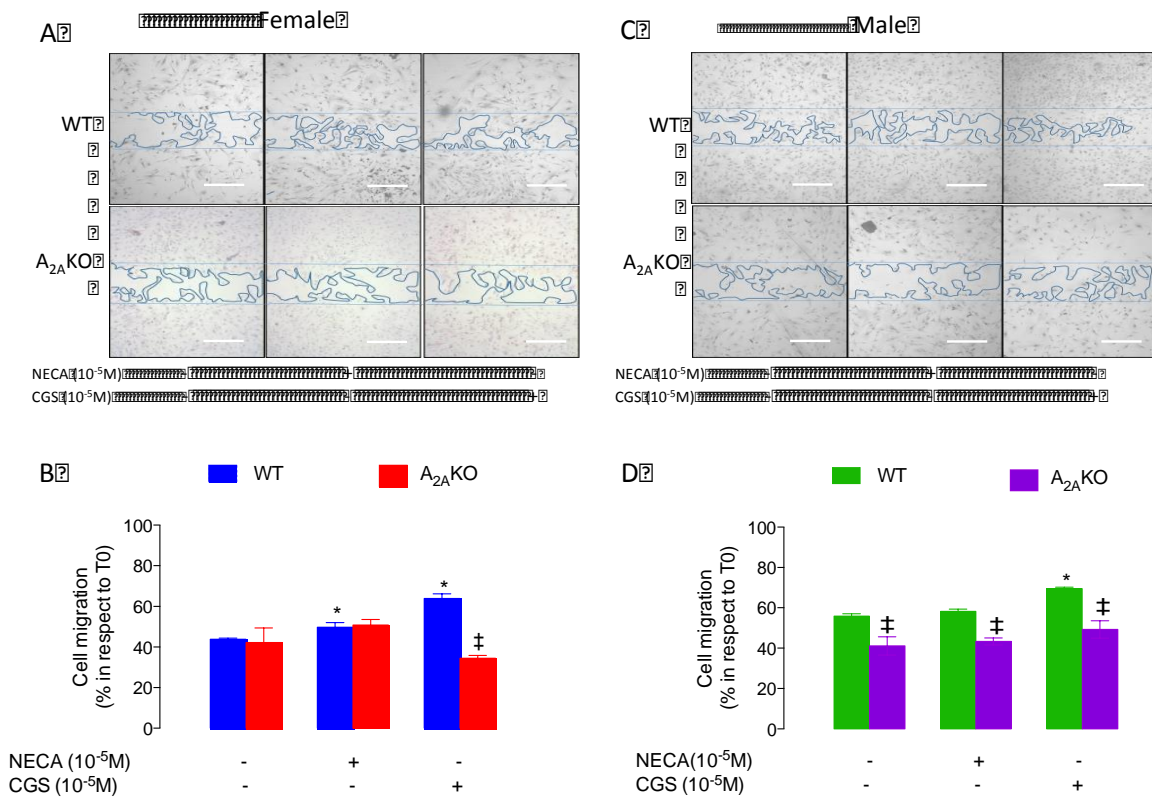
**Figura 7: Caracterización de células endoteliales de pulmón (CEP):** **A)** Células endoteliales proveniente de tejido pulmonar seleccionadas mediante inmunoselección con CD31 + (positivo) imagen derecha y CD31-(negativo) izquierda, como se indican con sus respectivas flechas. **B)** Blots de marcadores de células endoteliales, receptor VEGF 2 (KDR) y CD-34 normalizado con sus respectivas  $\beta$ actina. **C)** Los resultados presentan cantidad de proteína en marcadores en KDR/actina y CD34/actina, expresado en unidades arbitrarias frente a cultivo enriquecido de células endoteliales CD31 + y no enriquecido CD31 – en grupos de células Control (WT, azul) y  $A_{2A}$ KO (rojo). **D)** formación de tubos a diferentes concentraciones de suero (0,1 a 2 %). En C, análisis no paramétrico \* $P < 0.05$  versus células WT CD31-. † $P < 0.05$  versus células KO CD31-. Valores se expresan en media  $\pm$  SEM. n=3 a 5 por grupo.



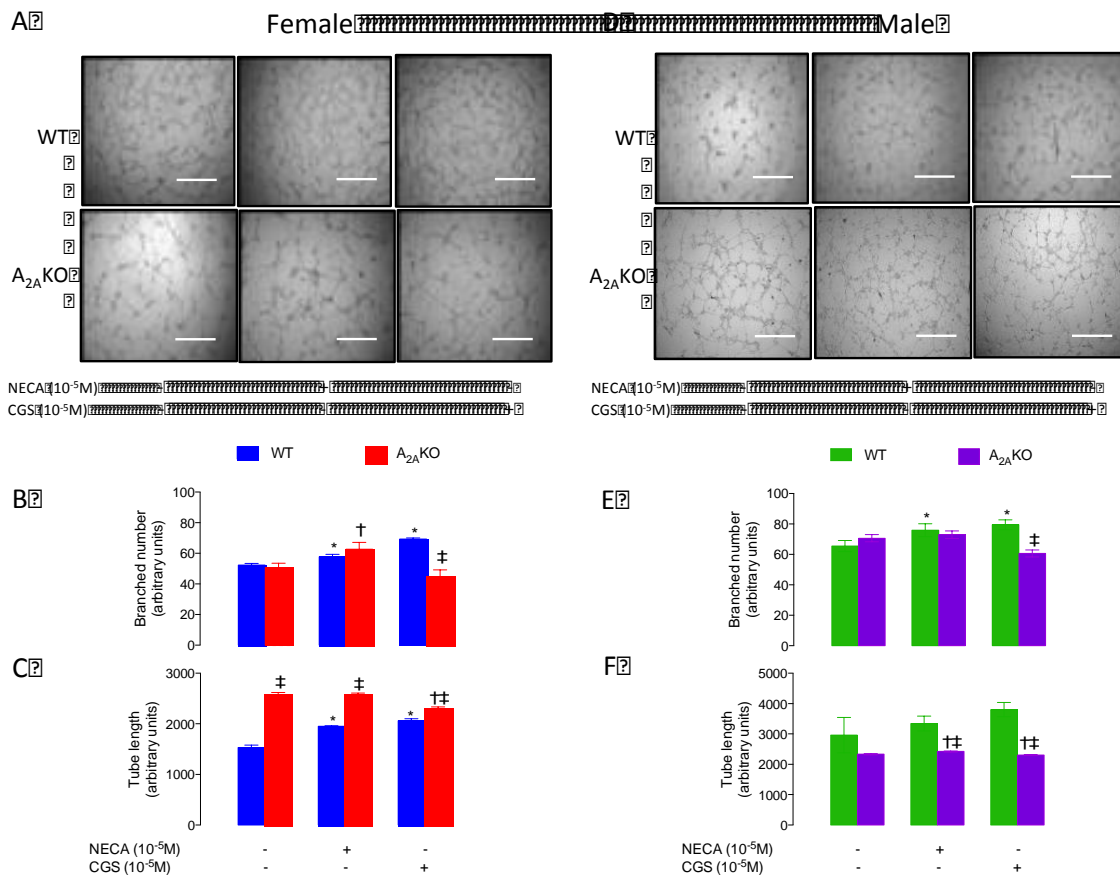
**Figura 8: Expresión receptores de adenosina en ratones hembras y macho:** Células endoteliales de pulmon proveniente de ratones control (WT) o deficientes en el receptor A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>KO) hembras y machos fueron utilizadas para análisis de mRNA de los receptores de adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2B</sub>, y A<sub>3</sub>. Se utilizó el gen de neomicina insertado en el ratón A<sub>2A</sub>KO y como control de carga el gen de mlp37 (ribosomal). Para caracterización del sexo se utilizó gen Jarid doble bandaje (macho) y banda única (hembra). A) Resultados en células provenientes de hembras. Panel superior imágenes representativas de los geles para los genes en estudio. Y el panel inferior muestra la densitometría de las bandas encontradas para los receptores de adenosina normalizados para mlp37. B) Similar a lo mostrado en A, para el caso de los machos. Análisis estadístico t-test pareado paramétrico. \*P<0.05 vs respectivo gen en células de ratones control. Valores se expresan en media ± SEM, n=4 por grupo.



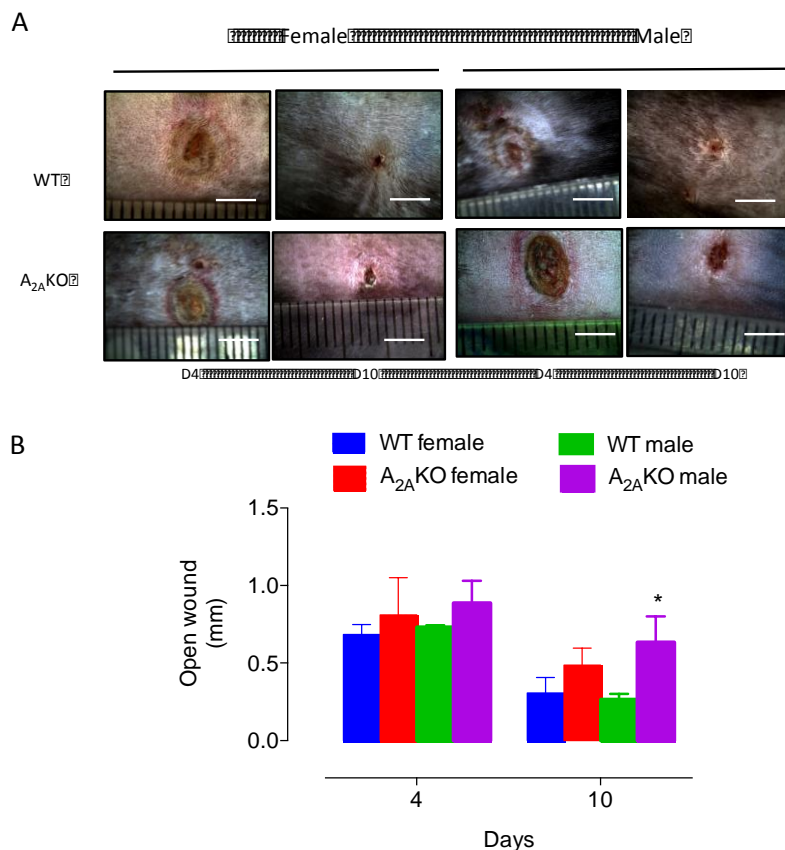
**Figura 9 Proliferación celular.** Células de endotelio pulmonar provenientes de ratones control (WT) o A<sub>2A</sub>KO ya sea hembras o machos fueron estimuladas con agonista selectivo del receptor A<sub>2A</sub> (CGS-21680) o el agonista no selectivo de todos los receptores de adenosina (NECA). **A)** Respuesta proliferativa en curva dosis respuesta en hembras y **B)** Machos control (WT) o A<sub>2A</sub>KO co-incubadas con NECA. **C)** Curva dosis respuesta en proliferación en células de ratones (hembras y machos) control (WT). **D)** Proliferación celular en respuesta a CGS-21680 (10<sup>-5</sup> M) en células de animales control y A<sub>2A</sub>KO hembras o machos. Barras: azul hembra Control, verde macho Control, rojo: hembra A<sub>2A</sub>KO, purpura macho A<sub>2A</sub>KO. † P<0.05 vs respectiva condición en animales control según sexo. Valores se expresan en media ± SEM, n=3 por grupo en triplicado.



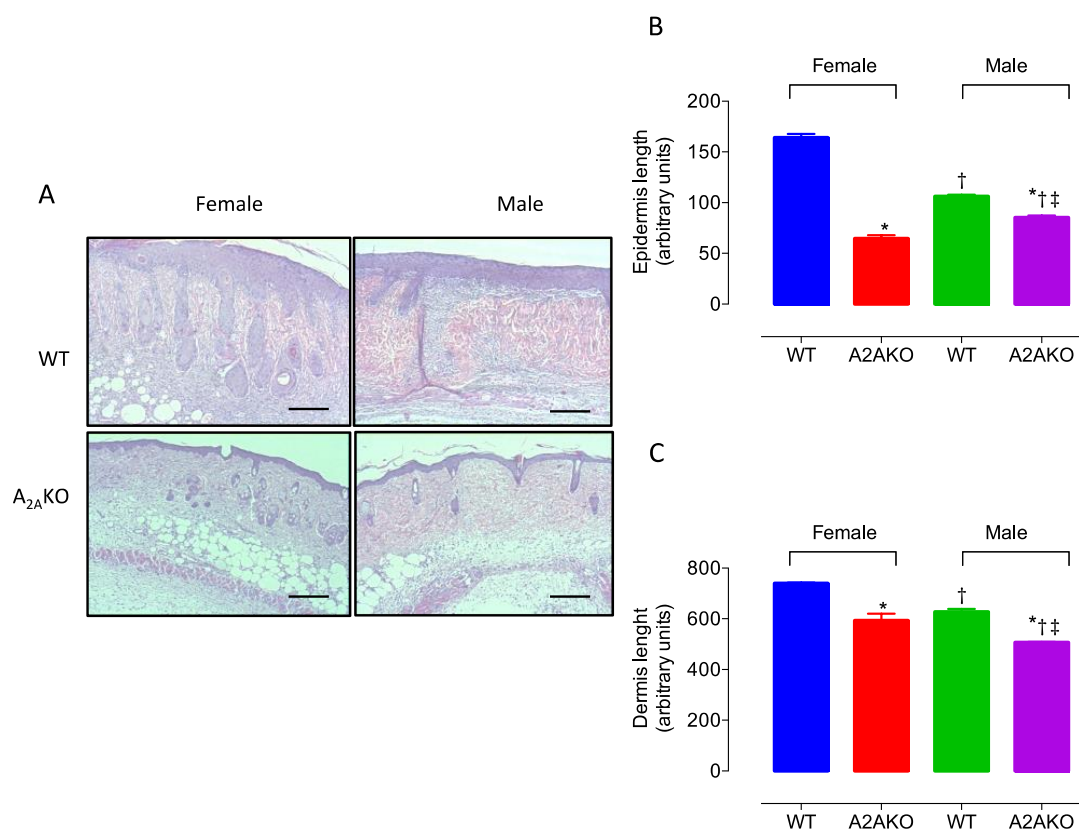
**Figura 10 Ensayo migración celular:** Células endoteliales WT y A<sub>2A</sub>KO de hembras y machos provenientes de tejido pulmonar son sembradas en placa placas petri de 60 mm para luego realizar herida y coincubarlas con agonista no selectivo de los receptores de adenosina (+, NECA, 10<sup>-4</sup>M, 12 horas) o con el agonista selectivo para el receptor A<sub>2A</sub> (+, CGS-21680, 10<sup>-5</sup> M, 12 h). **A)** Figuras representativas de los ensayos en hembras. **B)** Cuantificación de los ensayos en A. **C)** Figuras representativas de los ensayos en machos. **D)** Cuantificación de los ensayos en C. Cuantificación expresada en porcentaje de migración respecto al tiempo cero (T-0). Barras azul y rojas, corresponden a hembras WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. Barra verde y purpura, corresponden a machos WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. \*P<0.05 versus condición basal (-) en ratones control (WT). ‡P<0.05 vs respectiva condición en ratones control (WT). Valores se expresan en media ± SEM, n=3-4 por grupo.



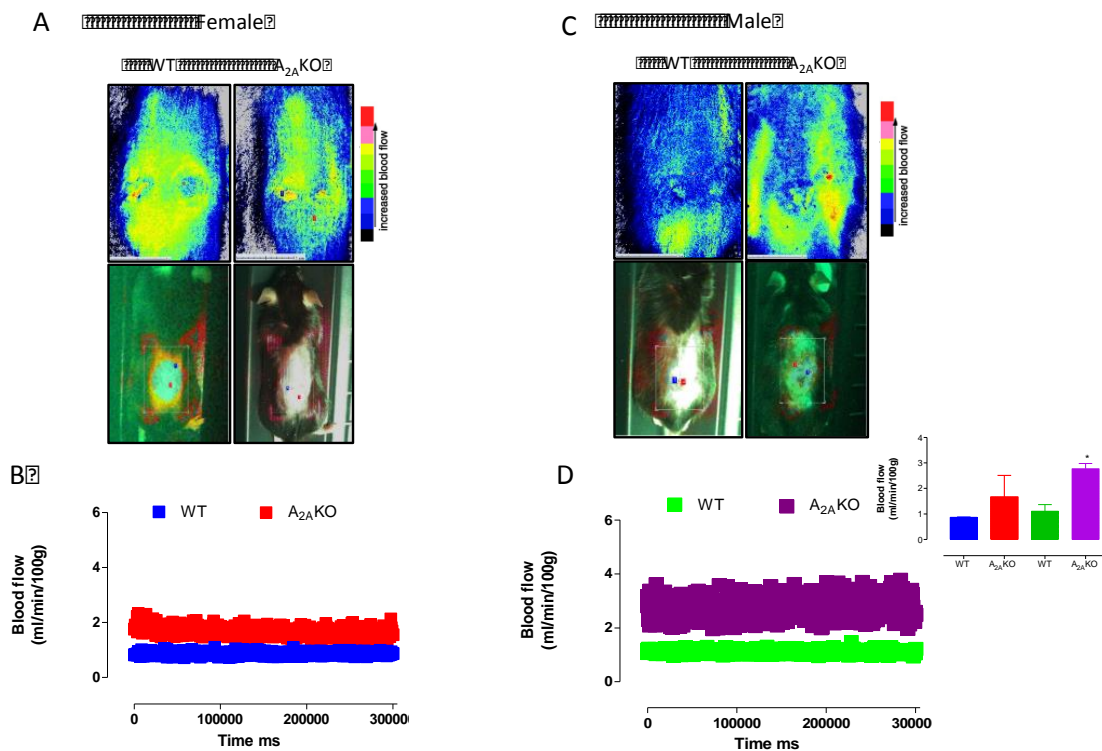
**Figura 11: Ensayo celular de formación tubos:** Cultivo de células endoteliales pulmonares fueron utilizadas para ensayo formación de tubos en presencia de NECA (10<sup>-5</sup> M, 4 h) o CGS-21680 (10<sup>-5</sup> M, 4h). **A)** Figura representativa de experimentos realizados en hembras. **B)** Cuantificación de la formación de redes (branched) según lo indicado en A. **C)** Cuantificación de la longitud de los tubos según lo indicado en A. **D)** Figura representativa de experimentos realizados en machos. **E)** Cuantificación de la formación de redes (branched) según lo indicado en D. **F)** Cuantificación de la longitud de los tubos según lo indicado en D. Barras azul y rojas, corresponden a hembras WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. Barra verde y purpura, corresponden a machos WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. \*P<0.05 versus condición basal (-) en ratones control (WT). † P<0.05 vs condición basal en ratones A<sub>2A</sub>KO. ‡P<0.05 vs respectiva condición en ratones control (WT). Valores se expresan en media ± SEM. n=3-4 por grupo.



**Figura 12: Evolución de cicatrización en el tiempo.** A los ratones control y A<sub>2A</sub>KO hembras y machos se les indujo una herida en el dorso mediante una escisión (10 mm de diámetro). El seguimiento en el tiempo fue cada dos días partiendo del día cero (D0) hasta el día diez (D10). A) Figura representativa de heridas en ratones hembras y machos de los grupos analizados. B) Diámetro de la herida a los 4 (D4) o D10 de seguimiento. Barras azul y rojas, corresponden a hembras WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. Barra verde y purpura, corresponden a machos WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. \*P<0.05 versus respectiva condición en ratones control (WT). Valores se expresan en media ± SEM. n=3-4 por grupo.

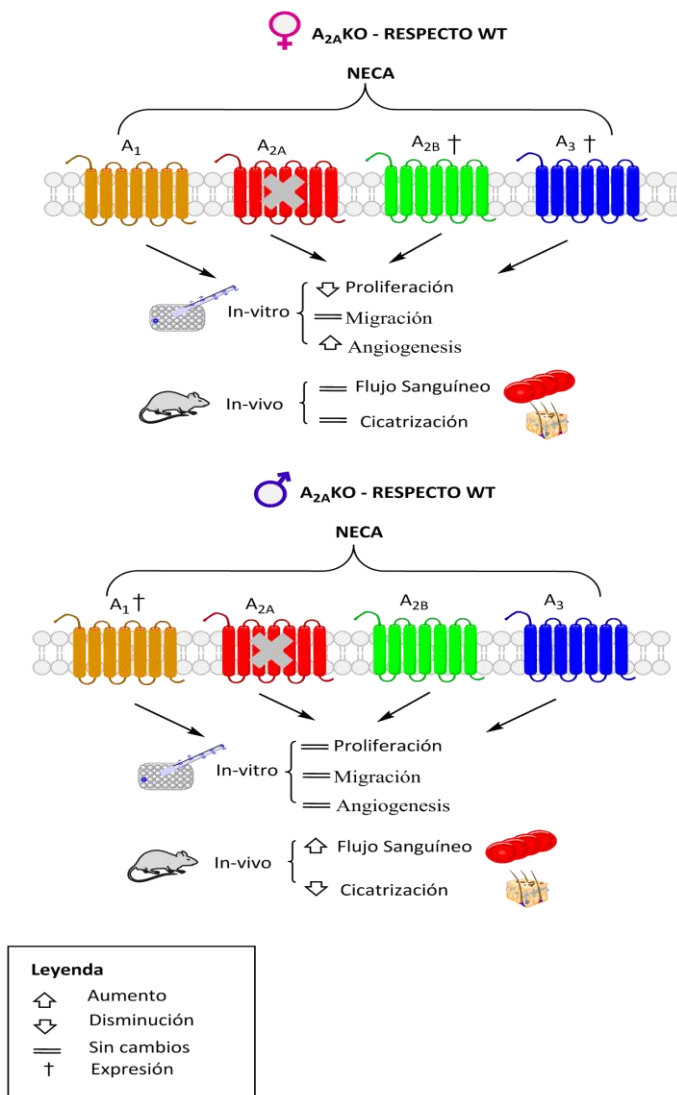


**Figura 13: Histología en tejido cutáneo de ratón:** Secciones de lesiones cutáneas obtenidas el día cuatro (D4) de cicatrización, provenientes de ratones hembras y machos control (WT) y A<sub>2A</sub>KO. Las heridas disecadas se fijaron y se incluyeron en parafina, donde posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las imágenes son tomadas en aumento 40X. A). Figuras representativas de los experimentos en los grupos de análisis. B) Longitud de la epidermis, C) Longitud de la dermis en los grupos WT y A<sub>2A</sub>KO. Barras azul y rojas, corresponden a hembras WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. Barra verde y purpura, corresponden a machos WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. \*P<0.05 versus hembras control (WT). <sup>†</sup>P<0.05 vs hembras A<sub>2A</sub>KO. <sup>‡</sup>P<0.05 vs machos control (WT). Valores se expresan en media ± SEM. n=3-4 por grupo.



**Figura 14. Medición del flujo sanguíneo en cicatrización de heridas dorsal en ratones hembras y machos en grupos especie control y A<sub>2A</sub>KO:** **A)** Imagen Laser Doppler detección de perfusión sanguínea en heridas del día cuarto de cicatrización (T4) en hembras y **C)** machos para los grupos Control y A<sub>2A</sub>KO. **B)** Gráfico de puntos del flujo sanguíneo expresada en ml/min/ 100g, en ratones hembra y **D)** machos para los grupos Control y A<sub>2A</sub>KO. Barras azul y rojas, corresponden a hembras WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. Barra verde y purpura, corresponden a machos WT y A<sub>2A</sub>KO, respectivamente. \*P<0.05 versus machos control (WT). Valores se expresan en media ± SEM. n=3 por grupo.





**Figura 15. Resumen tesis:** Esquema de hitos mas importantes en el desarrollo de la tesis realizando ensayos in-vitro e in.vivo en ratones control (WT) y A<sub>2A</sub>ARKO, de esto incluyen proliferacion,migracion y formmacion de tubos en celulas endoteliales de pulmon.Mientras que en animal directo se realizo ensayo de herida dermal y perfusion sanguinea en heridas expuestas.

## 9 Anexos

Autorización Comité de Bioética y Bioseguridad, Universidad del Bio Bio.



### CERTIFICACION

El Comité de Bioética de la Universidad del Bío-Bío, conformado por Dr. Sergio Acuña N. (Director de Investigación, Docente), Dr. Julio Alarcón E. (Docente), Dr. Carlos Escudero O. (Docente), Mg. Nelson Zicavo (Docente), Dr. Carlos Céspedes A. (Docente), con fecha 8 de Octubre de 2013, ha revisado el Proyecto FONDECYT Regular titulado "Role of angiogenesis mediated by the A2AAR/VEGF signaling pathway in the generation of hypertension in offspring born from pre-eclampsic pregnancies", cuyo autor es la Dr. Carlos Escudero O., académico de la Universidad del Bío-Bío, donde se llevará a cabo este proyecto.

Este Comité basa lo que a continuación se señala, en la lectura del proyecto presentado por el Dr. Escudero:

1. Se ha tenido a la vista los documentos de consentimiento informado que deberán firmar los participantes de la investigación.
2. La metodología a emplear, retiro de placenta, no vulnera la dignidad de las personas involucradas, por lo tanto no constituye una amenaza bajo ninguna circunstancia ni causa daño físico, emocional ni moral a los investigados.
3. Este comité garantizará el derecho a la privacidad y al anonimato de los sujetos de investigación.
4. El investigador establecerá y garantizará la confidencialidad de los datos de investigación, en los casos que así lo ameriten. Como también el derecho de las personas a retirarse o abandonar el estudio cuando así lo estimen.
5. El Comité ha comprobado que la investigación cumple con el respeto a los derechos humanos de los participantes y se ajusta a estándares científicos y éticos propios de la disciplina y de la Institución, los modelos de consentimiento toman en consideración los elementos señalados, con las garantías que se otorgan a sujetos vulnerables.

Así mismo, los laboratorios a utilizar cuentan con personal preparado y la infraestructura necesaria para realizar el estudio y procedimientos de eutanasia debidamente calificados y el número de individuos a ensayar se encuentran definidos y ajustados al protocolo de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento, de Russell & Burch, 1959).

Del mismo modo, se certifica que los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del presente proyecto, serán retirados y eliminados de acuerdo a los protocolos que la Institución dispone para ello.

La presente certificación se extiende para ser presentada al Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile.

Presidente

Comité Bioética y Bioseguridad  
Universidad del Bío-Bío

Comité Asesor de Bioética y  
Bioseguridad  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN  
Universidad del Bío-Bío

## Papers

### Papers publicados

- Acurio J, **Troncoso F**, Bertoglia P, Salomon C, Aguayo C, Sobrevia L, Escudero C. Potential role of A<sub>2B</sub> adenosine receptors on proliferation/migration of fetal endothelium derived from pre-eclamptic pregnancies. *BioMedical Research International*. 2014;2014:274507. doi: 10.1155/2014/274507. Epub 2014 Apr 28.

### Papers enviados

- **Troncoso F**, Herlitz K, Acurio J, Aguayo C, Covarrubias A, Escudero C. Reduced pro-angiogenic capacity in male A<sub>2A</sub> deficient mice. *Cardiovascular Research* (under review).
- Acurio J, Herlitz H, **Troncoso F**, Aguayo C, Bertoglia P, Escudero C. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor regulate expression of vascular endothelial growth factor receptor in normal and pre-eclamptic endothelium. *Plos One* (under review).
- **Troncoso F**, Acurio J, Herlitz K, Aguayo C, Bertoglia P, Guzman-Gutierrez E, Covarrubias A, Desoye G, Escudero C. Increased endothelial cell markers is associated with differential activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in gestational diabetes. *Plos One* (under review)
- Escudero C, Herlitz K, **Troncoso F**, Acurio J, Aguayo C, Roberts JM, Truong G, Duncombe G, Rice G, Salomon C. Role of extracellular vesicles and

*microRNAs on endothelial dysfunction during preeclamptic pregnancies. Frontiers in Physiology (under review).*

- Escudero C, Herlitz K, **Troncoso F**, Acurio J, Aguayo C, Gonzalez M. Cellular mechanisms behind pro-angiogenic role of insulin. *Frontiers in Physiology (under review).*

## Abstracts

- *Elevated pro-Angiogenic phenotype in feto-placental tissue from gestational Diabetes Mellitus. Placenta 36 (2015)*
- *Adenosine A2 regulate cell proliferation via nitric oxide synthesis in normal and Gestational Diabetes. Placenta 36 (2015)*
- *A2b-Mediated endothelial cell proliferation is associated with decoupling of the no and VEGF signaling pathway during Pre-Eclampsia. Placenta 35 (2014).*
- *A2a adenosine receptor is required for adenosine-mediated Angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells from normal and Pre-Eclamptic cells: Preliminary report. Placenta 35 (2014).*





