



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Unidad Monterrey**

**Impacto de la liberación controlada de Caveolina-1 en el daño  
endotelial**

Tesis que presenta

**Iván Misael López Rodulfo**

Para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en:

**Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de Tesis:

**Dr. Bruno A. Escalante Acosta**

Monterrey, N.L.

Agosto 2021

## **Impacto de la liberación controlada de Caveolina-1 en el daño endotelial**

© Iván Misael López Rodulfo

Asesor: Dr. Bruno A. Escalante Acosta

Sinodal: Dr. Daniel P. Sánchez Herrera

Sinodal: Dr. Jesús Santana Solano

Tesis de Maestría 2021

Centro de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV)

Nuevo León, México

## **Agradecimientos**

Al Dr. Bruno Escalante, porque además de darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, guiarme e instruirme la importancia de seguir rigurosamente el método científico, el apoyo brindado durante situaciones tan complicadas e inesperadas como lo es la crisis sanitaria a nivel mundial que seguimos afrontando es invaluable.

A mis sinodales, el Dr. Daniel Sánchez y el Dr. Jesús Santana, por sus valiosas aportaciones para las mejoras de este proyecto.

A M.C. Amelia Ríos, por la disposición prácticamente de tiempo completo para aprender, aplicar, desarrollar y sobre todo razonar congruentemente cada una de las técnicas llevadas a cabo en el proyecto. Además, infinitas gracias por el soporte y motivación, sobre todo cuando las cosas se tornaban complicadas.

A mi reducido grupo de laboratorio, Ángel, Ricardo, Franco y Jorge, pues de cada uno me llevo gratas enseñanzas, pero en especial a Elisa Villa, pues su paciencia, tiempo y amistad fueron cruciales durante mi estancia en el laboratorio.

Al CINVESTAV-Monterrey por brindarme la formación interdisciplinaria que es de gran importancia hoy en día

A CONACYT por el apoyo y beca otorgada para lograr la obtención del grado de maestría.

Por último, en quienes sé que puedo encontrar apoyo incondicional: mi familia quienes son mi motor y refugio para llevar el día a día; a Alondra cuya alegría y nobleza definitivamente mitiga el cansancio al final del día.



## Resumen

El proceso de reparación endotelial llevado a cabo por las células endoteliales es de vital importancia, pues mediante la proliferación y migración celular, permite la formación de nuevos vasos sanguíneos durante procesos de cicatrización, donde algún tejido u órgano ha sido dañado. Sin embargo, durante el crecimiento tumoral, este proceso es crucial y se ve acelerado puesto que las células cancerígenas necesitan de nuevos vasos sanguíneos para disponer de oxígeno y nutrientes. Por ende, múltiples terapias anticancerígenas están basadas en perturbar dicha función del endotelio vascular. Bajo este contexto, la Caveolina-1, es una opción prometedora por su capacidad de inhibir la síntesis del óxido nítrico, molécula estimulante de la proliferación y migración celular. No obstante, su empleo se ve limitado por las altas dosis requeridas para obtener el efecto inhibitorio deseado, lo que conlleva a la presencia de múltiples efectos adversos cuando es administrada exógenamente. Una alternativa para eficientizar el efecto de los fármacos y disminuir la dosis administrada, es el empleo de sistemas de entrega de fármacos activada por estímulos externos, como el sistema de microburbujas-ultrasonido. En este, se libera el fármaco justo en la zona en que se aplica el estímulo y se favorece su internalización a las células endoteliales debido al fenómeno de sonoporación. Por lo tanto, si se emplea dicho sistema para la liberación de la Caveolina-1 podría facilitar su incorporación en las células endoteliales, potenciando sus efectos inhibitorios sobre la función endotelial. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de la Caveolina-1 libre con el de la caveolina liberada a partir de un sistema de microburbujas-ultrasonido sobre el desarrollo de la reparación del daño endotelial. Para esto, se utilizó un modelo de reparación endotelial *in vitro* que permita detectar alteraciones de la función endotelial por medio del análisis de la velocidad de reparación. Los resultados mostraron que fue posible potenciar el efecto inhibitorio de la reparación endotelial por parte de AP-Cav con una dosis hasta 10 veces menor. Lo anterior, abre las puertas para proponer el sistema de liberación controlada descrito como una alternativa a las terapias anticancerígenas actuales, pues podría garantizar el efecto inhibitorio de la reparación endotelial por parte de AP-Cav durante el crecimiento tumoral con dosis considerablemente menores.



## Abstract

The repair of endothelium carried out by endothelial cells is a process of vital importance, through cell proliferation and migration, it allows the formation of new blood vessels during healing processes, where some tissue or organ has been damaged. However, during tumor growth, this process is crucial and accelerated since cancer cells need new blood vessels to provide them oxygen and nutrients. Therefore, multiple anticancer therapies are based on disturbing this function of the vascular endothelium. In this context, Caveolin-1 is a promising option due to its ability to inhibit the synthesis of nitric oxide, a molecule that stimulates cell proliferation and migration. However, its use is limited by the high doses required to obtain the desired inhibitory effect, which leads to the presence of multiple adverse effects when it is administered exogenously. An alternative to make the effect of drugs more efficient and reduce the administered dose is the use of drug delivery systems activated by external stimuli, such as the microbubble-ultrasound system. In this, the drug is released just in the area where the stimulus is applied and its internalization to endothelial cells is promoted due to the phenomenon of sonoporation. Therefore, if this system is used for the release of Caveolin-1, it could facilitate its incorporation into endothelial cells, enhancing its inhibitory effects on endothelial function. The objective of this work was to compare the effect of free Caveolin-1 with that of caveolin released from a microbubble-ultrasound system on the development of endothelial damage repair. For this, an *in vitro* endothelial repair model was used to detect alterations in endothelial function by analyzing the speed of repair. The results showed that it was possible to enhance the inhibitory effect of endothelial repair by AP-Cav with a dose up to 10 times lower. This opens the doors to propose the controlled release system described as an alternative to current anticancer therapies, as it could guarantee the inhibitory effect of endothelial repair by AP-Cav during tumor growth with considerably lower doses.



# Índice General

1	Introducción .....	1
2	ANTECEDENTES.....	7
2.1	El óxido nítrico y la angiogénesis.....	7
2.2	Efecto de la Caveolina sobre la función endotelial.....	8
2.3	Liberación controlada de la AP-Cav de un sistema de microburbujas-ultrasonido potencia su efecto inhibitorio.....	12
3	Justificación.....	14
4	Hipótesis.....	15
5	Objetivos .....	16
5.1	Objetivo general.....	16
5.2	Objetivos particulares .....	16
6	Metodología .....	17
6.1	Síntesis y caracterización de microburbujas aniónicas.....	17
6.1.1	Preparación de mezcla y película de lípidos.....	18
6.1.2	Hidratación de la mezcla y formación de liposomas multilamelares .....	19
6.1.3	Lavados y recuperación de microburbujas aniónicas .....	19
6.1.4	Caracterización de microburbujas aniónicas .....	20
6.2	Síntesis y caracterización de microburbujas con AP-Cav .....	21
6.2.1	Incubación de microburbujas aniónicas con AP-Cav.....	21
6.2.2	Cuantificación de microburbujas con AP-Cav y distribución de tamaños.....	21
6.2.3	Curva estándar de AP-Cav .....	21
6.2.4	Eficiencia de unión de AP-Cav a las microburbujas .....	22
6.3	Arreglo experimental de ultrasonido .....	23
6.4	Cultivos celulares.....	24
6.4.1	Curva control de crecimiento celular.....	24
6.4.2	Viabilidad celular .....	25

6.5	Efecto inhibitorio de la reparación endotelial inducido por AP-Cav.....	25
6.5.1	Ensayo de reparación de la herida (Wound healing).....	26
6.5.2	Procesado de imágenes para determinar el área de la estría.....	27
6.5.3	Determinación de la velocidad de reparación.....	27
6.6	Efecto de la AP-Cav sobre la velocidad de reparación.....	29
6.7	Efecto de la liberación controlada de AP-Cav unido a las microburbujas sobre la velocidad de reparación .....	29
7	Resultados .....	31
7.1	Caracterización de las microburbujas .....	31
7.2	Curva de crecimiento y formación de monocapa de las células bEnd.3.....	32
7.3	Ensayo de reparación de la herida para evaluar la función endotelial .....	34
7.4	Efecto inhibitorio de la reparación endotelial inducido por AP-Cav.....	38
7.5	Viabilidad celular.....	40
7.6	Efecto de la liberación controlada de AP-Cav unido a las microburbujas sobre la reparación endotelial.....	41
8	Discusión.....	44
9	Conclusiones .....	47
10	Perspectivas.....	48
11	Bibliografía.....	49

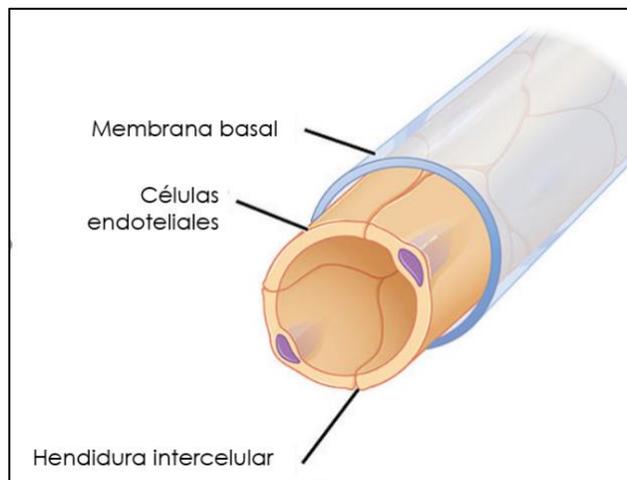
## Índice de Figuras

1-1 Estructura del capilar sanguíneo .....	1
1-2 Proceso de angiogénesis durante el crecimiento tumoral.....	3
1-3 Regulación intracelular de la eNOS .....	4
1-4 Sistema de microburbujas-ultrasonido .....	5
2-1 Efecto de la ablación del gen codificante para eNOS sobre la cicatrización .	7
2-2 Efecto de la ablación de la eNOS sobre el crecimiento tumoral .....	8
2-3 Efecto inhibitorio de AP-Cav sobre la síntesis de ON inducida por VEGF ...	9
2-4 Efecto inhibitorio de la Cavtratina sobre la neovascularización ocular (CNV).	10
2-5 Transfección de Caveolina disminuye a perfusión sanguínea tumoral .....	10
2-6 Efectos de la Cavtratina sobre la función endotelial .....	11
2-7 Microburbuja lipídica unida a AP-Cav .....	12
2-8 Efecto inhibitorio de la relajación inducido por la liberación controlada de AP-Cav.....	13
6-1 Protocolo experimental .....	17
6-2 Proceso de síntesis de microburbujas por agitación mecánica (amalgamación)	18
6-3 Arreglo experimental de ultrasonido para cultivos celulares .....	24
6-4. Esquema general del ensayo de reparación de la herida.....	26
7-1 Distribución de tamaños de microburbujas con AP-Cav unido .....	31
7-2 Eficiencia de unión de AP-Cav a microburbujas.....	32
7-3 Tinción de Hoechst para núcleos celulares .....	32
7-4 Curva de crecimiento de las células bEnd.3 .....	34
7-5 Reparación del daño endotelial con el ensayo de reparación de la herida por células bEnd.3.....	35
7-6 Procesado de imágenes para ensayo de reparación de la herida .....	36
7-7 Imágenes procesadas para el ensayo de reparación de la herida .....	37
7-8 Reducción del área de la estría en el tiempo debido a la reparación endotelial..	38
7-9 Velocidad de reparación del grupo control y el vehículo .....	39
7-10 Velocidad de reparación ante distintas concentraciones de AP-Cav .....	39
7-11 Porcentaje de inhibición de la reparación endotelial en comparación con el grupo Control .....	40

7-12 Ensayo de viabilidad celular .....	<b>41</b>
7-13 Efecto de los diferentes componentes del sistema de microburbujas- ultrasonido sobre la velocidad de reparación .....	<b>42</b>
7-14 Porcentaje de inhibición de la reparación endotelial de AP-Cav libre (1 $\mu$ M) y liberada a partir del sistema de microburbujas ultrasonido (0.13 $\mu$ M) .....	<b>43</b>

# 1 Introducción

El endotelio vascular es una monocapa de células endoteliales ancladas a una lámina basal de glicoproteínas que en conjunto forman a los capilares sanguíneos (Figura 1-1) y constituyen la parte más interna de arterias y venas [1]. El endotelio conforma una interfase entre la sangre circulante en el lumen de los vasos y el resto de la pared vascular o tejidos, de manera que tienen el papel fundamental de controlar el intercambio de solutos, fluido, gases, macromoléculas, hormonas, plaquetas y células sanguíneas entre los distintos tejidos y el flujo sanguíneo [2].



*Figura 1-1. Estructura del capilar sanguíneo. La parte más interna corresponde a la monocapa de células endoteliales ancladas a una membrana basal de glicoproteínas [3].*

En adición a su relevante función como barrera semipermeable, el endotelio vascular representa el órgano que mantiene funciones de vital importancia, como las que se describen a continuación:

- **Coagulación sanguínea.** El endotelio vascular normalmente provee una superficie sobre la cual las células sanguíneas como plaquetas y leucocitos no puedan adherirse, evitando la formación de coágulos, además de la secreción de compuestos anticoagulantes y antitrombóticos [4].
- **Inflamación.** Debido a su función como barrera semipermeable, el endotelio vascular participa activamente durante el proceso inflamatorio [4], además de

intercambiar moléculas de señalización directamente con los linfocitos T y B del sistema inmune [5].

- **Tono vascular.** Por medio de la secreción de moléculas de señalización, el endotelio vascular se encarga de mantener la homeostasis de los vasos sanguíneos al constreñir y relajar las arterias y venas [6].
- **Reparación vascular.** Mediante una alta tasa de proliferación y migración celular, las células endoteliales llevan a cabo la formación de nuevos capilares y vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes durante la cicatrización o reparación de tejido dañado derivado de heridas, situaciones de coagulación o isquemia [7].

Si bien, dichos procesos son claves para mantener la homeostasis sanguínea, el endotelio vascular, también participan activamente durante ciertas condiciones patológicas, como el crecimiento tumoral, donde la formación de nuevos vasos se ve acelerada. Durante este proceso, denominado angiogénesis, las células endoteliales de los vasos sanguíneos próximos al tumor, reconocen moléculas de señalización como el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) o señales de hipoxia en el ambiente, generado por las células cancerígenas. Estas señales promueven la degradación enzimática de la lámina basal, seguida de un proceso acelerado de proliferación y migración de las células endoteliales hacia el tumor. Por último, este proceso culmina con la formación de estructuras tubulares que vascularizan e irrigan de sangre al tumor (Figura 1-2) [11, 14]. Los nuevos vasos que se desarrollan durante esta patología son de gran importancia para el desarrollo tumoral, pues sirven para llevar oxígeno y nutrientes a las células cancerígenas, que ante la alta tasa metabólica que presentan, requieren de una mayor perfusión sanguínea, siendo la angiogénesis un factor crítico para su desarrollo, al grado de determinar el tamaño del tumor, así como su esparcimiento o metástasis [11, 12, 13].

Para que las células endoteliales lleven a cabo la formación de nuevos vasos, requieren de la síntesis y liberación de distintas moléculas de señalización, entre las que destaca el óxido nítrico (ON), molécula altamente reactiva y liposoluble, sintetizada a partir de la arginina por la enzima Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS) [8]. Bajo condiciones normales, el ON es esencial para la función de las células endoteliales, pues participa activamente como vasodilatador y regulador de la permeabilidad celular, entre otros procesos [5,10] Sin embargo durante el cáncer su síntesis se ve acelerada debido a una alta tasa de actividad de la eNOS. Lo anterior, ocurre porque la eNOS es una molécula

que se activa en respuesta al VEGF liberado por las células cancerígenas, de esta forma la proliferación y migración de las células endoteliales se ve acelerada, y con ello, el proceso de angiogénesis.

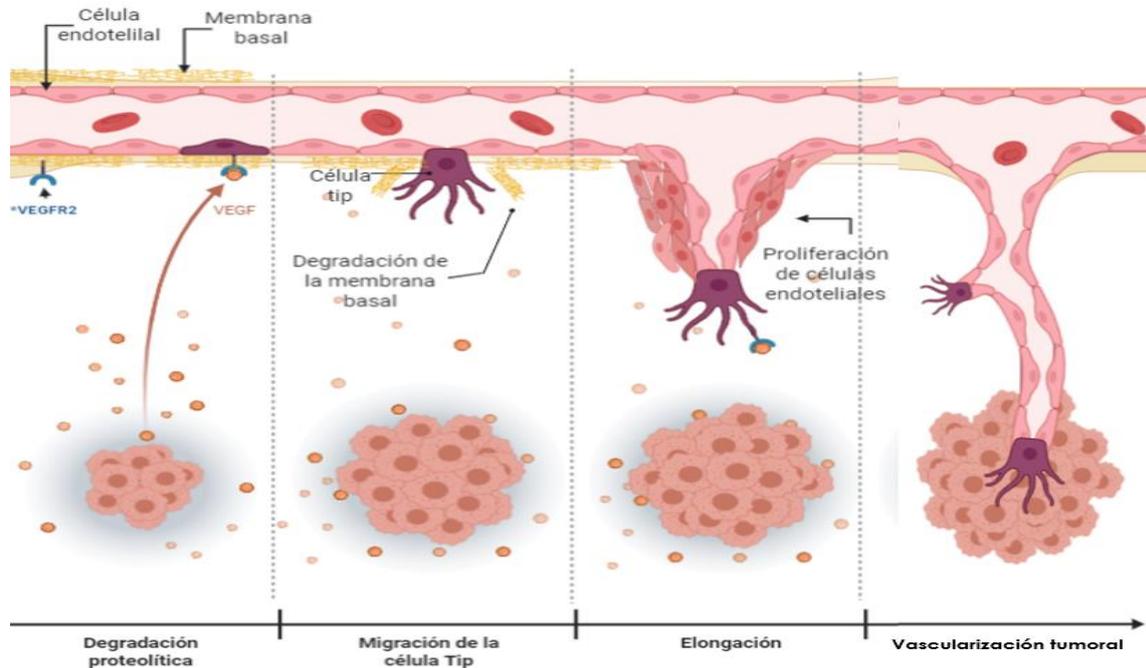


Figura 1-2. Proceso de angiogénesis durante el crecimiento tumoral.

En vista de que la síntesis del ON por parte de la eNOS es un estimulante de la angiogénesis [15,16], la inhibición de dicha enzima ha sido de gran interés para reducir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Una opción que se ha estudiado para disminuir la actividad de la eNOS está basada en su mecanismo de regulación intracelular, ya que la eNOS es una enzima que se encuentra inactiva cuando está unida a la membrana plasmática, específicamente, cuando está unida a Caveolina-1 (Cav-1), que es una proteína presente en las invaginaciones membranales denominadas como caveolas. Esta inactivación de la eNOS es altamente específica, debido a que la Cav-1 cuenta con un dominio de anclaje (aminoácidos 82-101, Cav), el cual es altamente afín a la eNOS [17].

Para que la eNOS se active, es necesaria su separación de la Cav y tal como se describe en la Figura 1-3, esto ocurre ante la interacción de moléculas externas, como el VEGF, con sus receptores en la membrana celular. Lo anterior, promueve la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes y la liberación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, generando un incremento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto, origina la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, que desplaza a la Cav de su unión con la eNOS,

permitiendo así la activación de la enzima. Finalmente, el proceso culmina con la apropiada síntesis de ON [18]. Dicha cascada de señalización indica que hay una competencia entre la Cav-1 y el complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina. Por ende, una mayor cantidad o presencia de Cav-1 supondría una menor actividad de la eNOS [25].

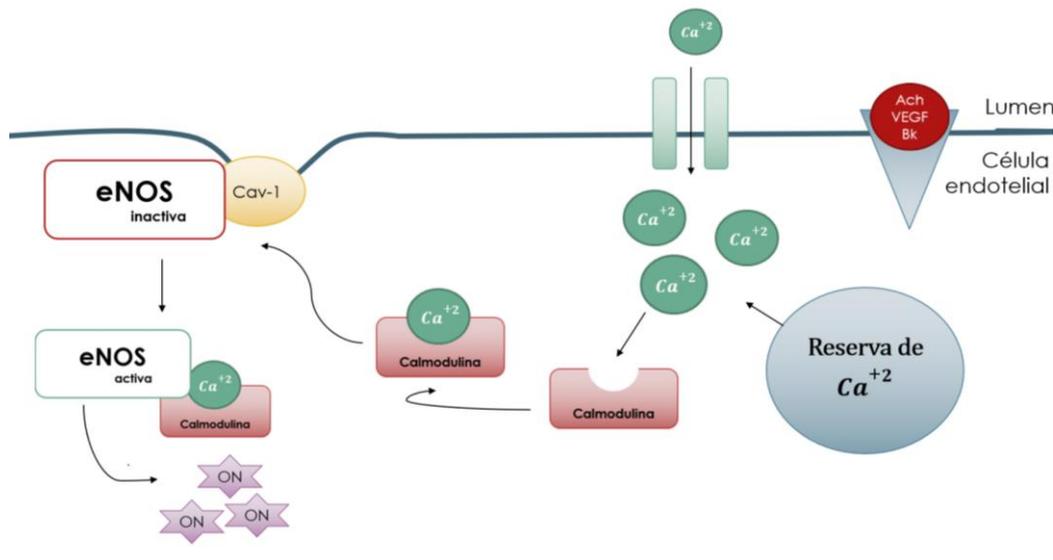


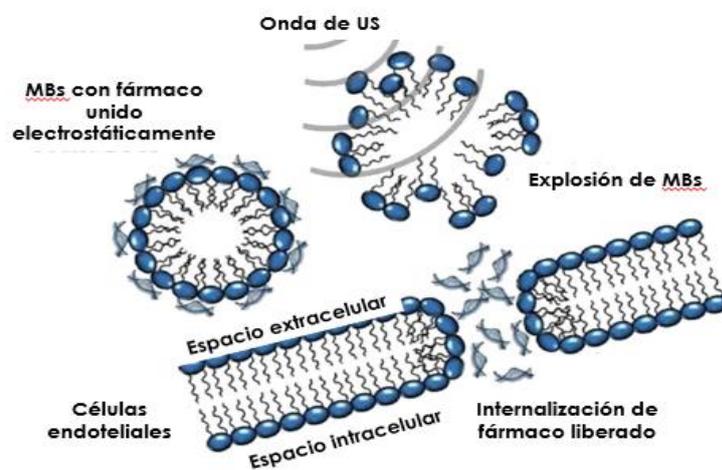
Figura 1-3. Regulación intracelular de la eNOS

Debido a lo antes expuesto, la inhibición de la eNOS por parte de Cav-1 ha sido de gran interés pues la inactivación de la enzima es específica por su alta afinidad al dominio de anclaje, a diferencia de los múltiples inhibidores de la síntesis del ON en existencia, de los cuales, la gran mayoría son inhibidores competitivos o no selectivos [22] donde la reducción de la tasa de actividad es menos eficiente. Sin embargo, la internalización celular de la Cav-1 para ser utilizada como inhibidor, representa todo un reto por superar para su administración de manera exógena. Para esto, se propuso la fusión del su dominio de anclaje con un segmento del homeodominio de Antennapedia, un factor de transcripción de *Drosophila*, el cual ha mostrado la capacidad de translocarse desde el espacio extracelular hacia el citoplasma en una manera independiente de, formando así un péptido catiónico permeable llamado AP-Cav [19].

Una vez que se logró la internalización de la caveolina en su forma AP-Cav a las células endoteliales, se comprobó su capacidad de inhibición de la eNOS, lo que redujo la síntesis del ON y con ello sus funciones a nivel endotelial como lo es en la inflamación y angiogénesis tumoral [20]. Puesto que el uso de la Cav como inhibidor de la síntesis de ON dependiente de eNOS resultó atractivo, se ha sugerido su empleo en distintos procesos

patológicos donde el ON juega un papel relevante, funcionando como agente antiinflamatorio [17,21], antiangiogénico y antitumoral [23,24].

Sin embargo, pese a que se ha utilizado a la Cav de manera exógena con el fin de reducir el impacto que tiene la alta tasa de síntesis de ON por parte de eNOS en patologías como el cáncer y la inflamación, se han descrito diversos efectos adversos, como por ejemplo que debido a que la inhibición de eNOS en zonas no deseadas se promovió también la adherencia leucocitaria en vénulas saludables, lo que podría traer como consecuencia enfermedades tales como aterosclerosis, hipertensión, hipercolesterolemia, entre otras [26].



*Figura 1-4 Sistema de microburbujas-ultrasonido. Liberación controlada de un fármaco en un sistema de microburbujas-ultrasonido que permite su liberación en el sitio deseado y promueve su internalización por el efecto de la sonoporación [21]*

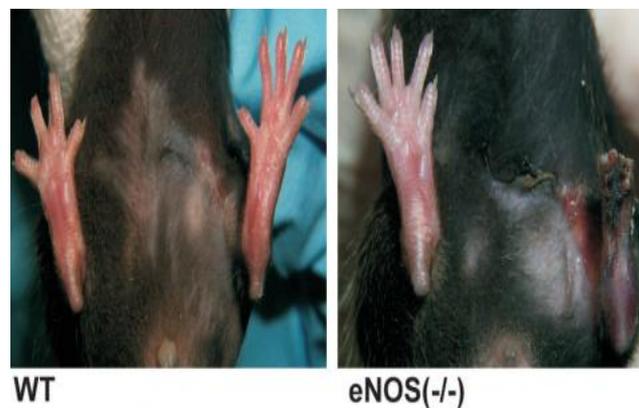
Debido a que son múltiples los fármacos que presentan esta problemática, con fines de disminuir la dosis administrada y con ello sus efectos adversos en sitios no deseados se han desarrollado diferentes sistemas de entrega de fármacos dirigidos y activados por estímulos externos, entre los que se encuentran la liberación de fármacos a partir de microburbujas (MBs) inducida por ultrasonido (US) [27]. Estas constan de un núcleo gaseoso y una envoltura que puede ser de diferente naturaleza como lo son lipídicas, proteicas o poliméricas, que permiten el acarreo de los fármacos mediante su incorporación directa en la envoltura, por unión electrostática, con enlaces biotina-avidina, entre otras técnicas [28]. Así, el uso de MBs es de gran interés pues como se observa en la Figura 1-4, además de liberar al fármaco en el lugar deseado con la aplicación del

ultrasonido, facilita su internalización por el efecto denominado como sonoporación, el cual es la formación de poros transitorios en la membrana endotelial [34] potenciando el efecto de los fármacos con el fin de reducir las dosis administradas.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 El óxido nítrico y la angiogénesis

Para comprobar el papel que tiene el ON en la angiogénesis se han realizado múltiples estudios, entre los cuales se encuentra la ablación del gen que codifica a la eNOS, es decir, producir líneas celulares u organismos genéticamente modificados que no tienen la capacidad de expresar a la eNOS denominados como “eNOS Knock Out (KO)”. De esta forma, Martínez-Ruiz y colaboradores en el 2019 trabajaron con dos tipos de rata, una rata eNOS (-/-) KO y una rata control “Wild Type” (WT). A ambas se les removió la arteria femoral y se observó como prácticamente la rata eNOS (-/-) perdió su capacidad de cicatrización debido a que no pudo generar nuevos vasos sanguíneos, por ende, su pata llegó al punto de necrosar, mientras que la rata WT, con su capacidad de sintetizar ON por medio de la eNOS, cicatrizó apropiadamente tras la remoción de la arteria mostrando mínimas afectaciones (Figura 2-1). Lo anterior indica la necesidad de la síntesis de ON por parte de la eNOS para llevar adecuadamente el proceso de angiogénesis.



*Figura 2-1 Efecto de la ablación del ON sobre cicatrización. Tratamiento de la remoción de arteria femoral aplicado en ratas. En el tipo WT cicatrizó correctamente mientras que en el tipo eNOS (-/-) KO la pata se necrosó [16]*

Bajo la misma idea de trabajar con organismos sin la capacidad de sintetizar ON por medio de la eNOS, se comprobó ahora la importancia del ON en la angiogénesis durante el desarrollo tumoral por Morais y colaboradores (2012), quienes utilizando modelos *in vivo*

monitorearon el crecimiento tumoral en dos grupos de ratones: control de tipo silvestre (WT) y eNOS (-/-) KO. Con el empleo de este modelo experimental, lograron observar una disminución en el tamaño del tumor en el grupo eNOS (-/-) KO, lo que revela que ante la incapacidad del organismo de sintetizar ON, el crecimiento tumoral se vio reducido notablemente (Figura 2-2, A), pero aún faltaba por demostrar que función celular alterada era responsable de este fenómeno.

Por esta razón, en el mismo trabajo mediante un estudio *ex vivo*, se comprobó que, en efecto el fenómeno observado en la reducción del tamaño tumoral se debe a que las células endoteliales del ratón eNOS (-/-) KO perdieron su capacidad de formar nuevos vasos tras su estimulación con el VEGF (Figura 2-2, B). De esta manera se reitera que la contribución del ON sobre la angiogénesis en el crecimiento tumoral es esencial para brindar de oxígeno y nutrientes a las células cancerígenas, por consiguiente, distintas opciones se han evaluado con el fin de inactivar a la eNOS en la vasculatura tumoral.

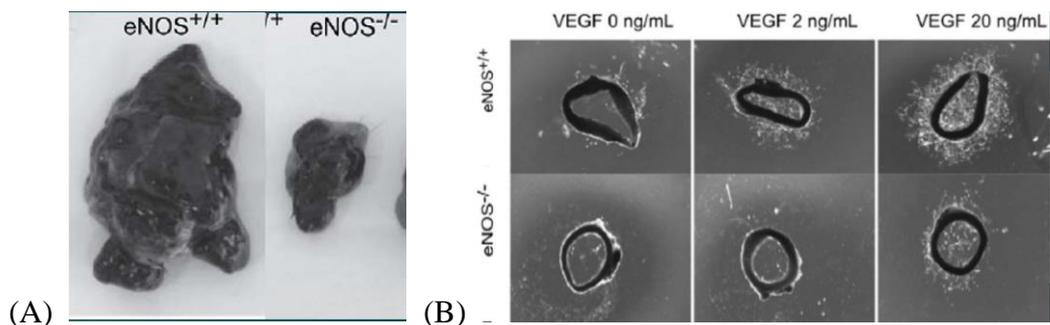


Figura 2-2. Efecto de la ablación de la eNOS en ratones durante el crecimiento tumoral. (A) Tumores extirpados del grupo control o eNOS (+/+) y el grupo eNOS (-/-) KO. (B) Estudio de angiogénesis *ex vivo* en anillos aórticos tras la estimulación con VEGF. En el grupo eNOS (-/-) se vio considerablemente disminuida la formación de estructuras tubulares [23].

## 2.2 Efecto de la Caveolina sobre la función endotelial

En vista del papel que tiene la síntesis del ON en las células endoteliales como estimulante de la angiogénesis, diferentes estudios han buscado disminuir su producción, basándose en el mecanismo de regulación interna de la eNOS, específicamente mediante la inactivación específica de la enzima por parte de la proteína Cav-1. Entre los distintos trabajos realizados con este fin se encuentra el llevado a cabo por Bernatchez (2004), quien

trabajó con AP-Cav y evaluó el efecto de su administración *in vitro* sobre la actividad de la eNOS inducida por el VEGF, obteniendo un efecto dosis-respuesta, donde a mayor concentración de AP-Cav administrada, menor fue la concentración de ON sintetizada (Figura 2-3).

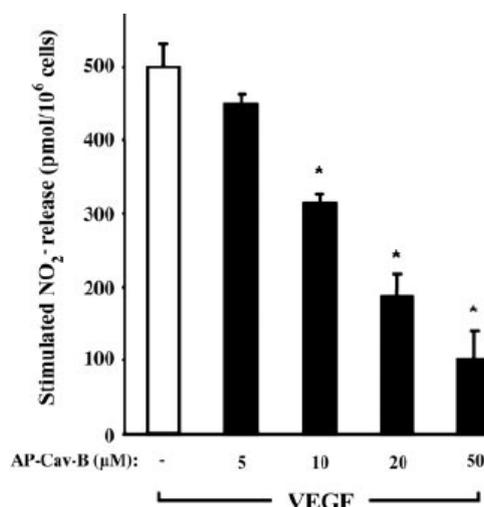


Figura 2-3 Efecto inhibitorio de la AP-Cav sobre la síntesis de ON inducida por VEGF [20].

Por otro lado, con un enfoque específico sobre la función endotelial, Jiang y colaboradores (2017), evaluaron el efecto de la administración del dominio de anclaje de la caveolina (Cavtratina) sobre la angiogénesis mediante un modelo de membranas fibrovasculares de retinopatía proliferativa diabética, logrando la inhibición de la neovascularización con una respuesta dosis dependiente, donde a mayor concentración de Cavtratina, menor fue la formación de nuevos vasos (Figura 2-4).

Sobre la misma dirección, pero ahora con el desarrollo de un estudio *in vivo*, Brouet y colaboradores (2005), estudiaron mediante la obtención de imágenes por láser Doppler (LDI por sus siglas en inglés) el efecto de la sobreexpresión de la Cav sobre la perfusión sanguínea en un modelo de tumor de tejido terciario linfóide en ratones. Para este fin, monitorearon a dos grupos: el grupo control transfectado con el vector Sham y el grupo transfectado con el gen codificante para la caveolina. Tras el monitoreo del tumor a los 0, 2, 4 y 6 días, se demostró que en el grupo tratado se disminuyó considerablemente el flujo de sangre en comparación al grupo control (Figura 2-5, A), lo que indica que la

sobreexpresión de la Cav, además de disminuir la angiogénesis, redujo también el crecimiento tumoral (Figura 2-5, B).

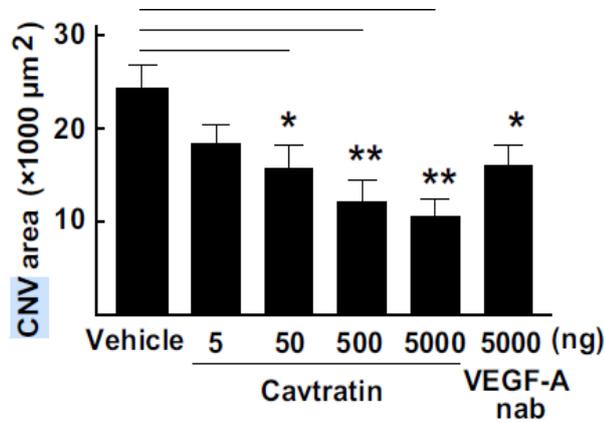


Figura 2-4 Efecto inhibitorio de la Cavtratin sobre la neovascularización ocular (CNV) en modelo de membranas fibrovasculares [52]

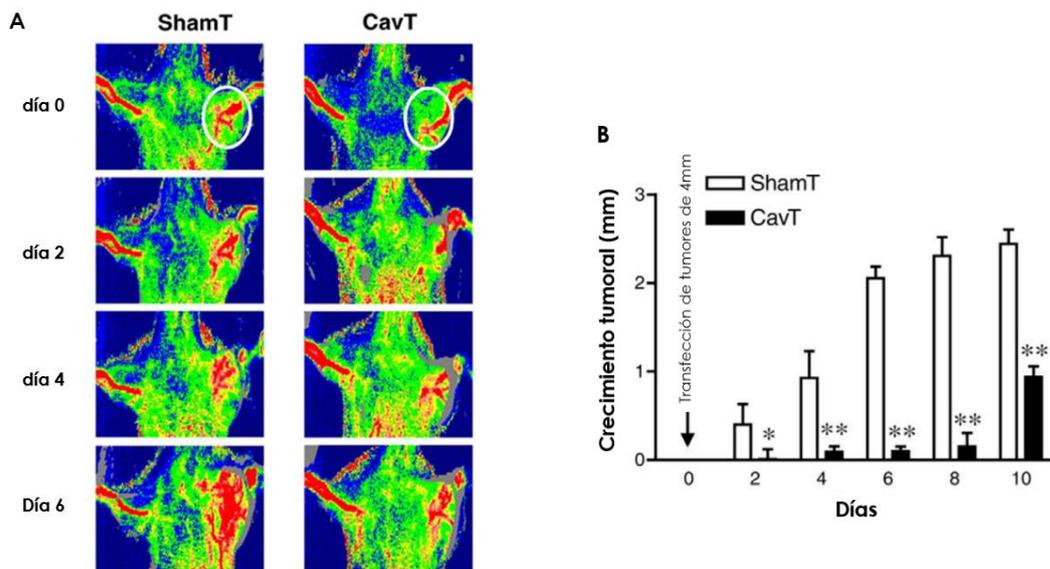


Figura 2-5. Transfección de caveolina disminuye la perfusión sanguínea tumoral. A) Imágenes obtenidas por LDI de tumor TLT en ratones a los 0, 2, 4 y 6 días después de la transfección con Sham y Caveolina. B) Determinación de los tumores TLT por medición del diámetro del tumor después de transfectar con Sham (barras blancas) y caveolina (barras negras).

Tras los múltiples estudios que demuestran el papel antiangiogénico de la Caveolina, aún era incierto que funciones celulares estaban siendo alteradas. Por esta razón Xu y colaboradores (2017), evaluaron el efecto de la Cavtratin *in vitro* sobre la supervivencia, proliferación, migración y permeabilidad de los tres principales tipos de células vasculares: células endoteliales, células de musculo liso y pericitos. Su trabajo, demostró que la Cavtratin suprimió la proliferación celular de los tres tipos celulares, pero fue solo en las células endoteliales donde se inhibió la supervivencia, proliferación, migración y permeabilidad celular (Figura 2-6). Lo anterior les permitió concluir que el efecto antiangiogénico de la Cavtratin se debe principalmente a sus efectos supresores sobre la función de las células endoteliales. Por lo tanto, estudios *in vitro* sobre el efecto de la Cav - o su dominio de anclaje - sobre la función de las células endoteliales serían modelos apropiados para prever el efecto que se observaría en un organismo.

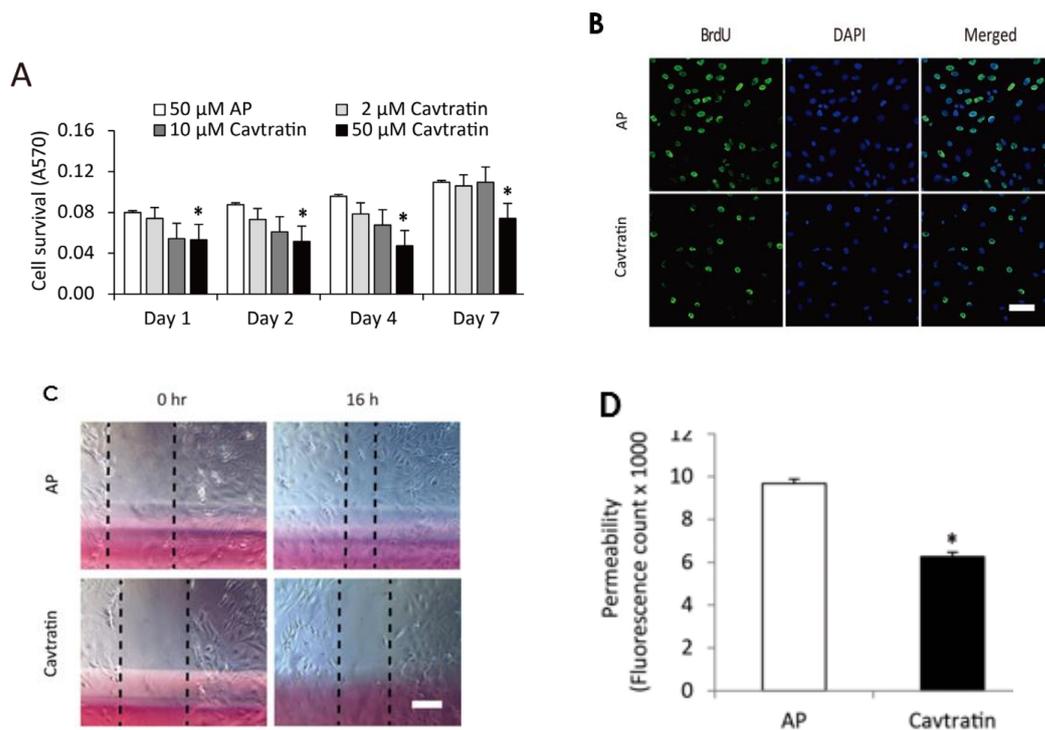


Figura 2-6. Efectos de la Cavtratin sobre la función endotelial. A) Concentraciones mayores a 50  $\mu$ M inhiben la supervivencia celular. B) Estudio el ensayo BrdU demuestra que la Cavtratin a 10  $\mu$ M inhibe la proliferación celular. C) Con el empleo de la técnica de reparación de la herida, se demuestra que la Cavtratin a 50  $\mu$ M inhibe la reparación del daño endotelial. D) Con la cuantificación por fluorescencia de la fuga de Dextrano-FITC se demostró que la Cavtratin a 50  $\mu$ M disminuye la permeabilidad celular.

## 2.3 Liberación controlada de la AP-Cav de un sistema de microburbujas-ultrasonido potencia su efecto inhibitorio

Ante los efectos adversos causados por la administración exógena de la AP-Cav descritos en la introducción, Navarro y colaboradores (2019) desarrollaron un sistema de liberación controlada de AP-Cav a partir de microburbujas de envoltura lipídica y núcleo gaseoso de perfluoropropano utilizando ultrasonido. Para desarrollar este sistema de entrega de fármacos, se llevó a cabo la unión de la AP-Cav a las microburbujas mediante la incorporación de un lípido de carga negativa en la envoltura de estas. Dicho lípido es el 1,2-Dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina (DPPS). Al ser la AP-Cav de carga positiva, solo fue necesaria la incubación de las microburbujas con la AP-Cav para lograr su unión por fuerzas de atracción electrostática (Figura 2-7).

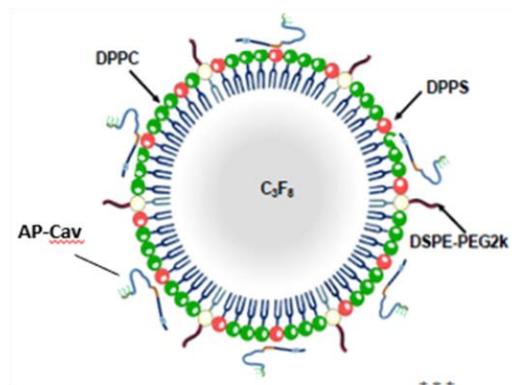


Figura 2-7 Microburbuja lipídica unida a AP-Cav. Estructura de la microburbuja con envoltura lipídica y núcleo gaseoso de perfluoropropano unida a AP-Cav por atracción electrostática

Una vez sintetizadas las microburbujas con AP-Cav unida, estas fueron administradas en conjunto con un sistema de ultrasonido para evaluar su efecto inhibitorio sobre la relajación vascular dependiente ON en anillos aórticos *ex vivo*. Para esto, se les aplicó un pretratamiento de Fenilefrina (Phe) a los anillos aórticos con el fin de inducir la contracción vascular, al observar la contracción máxima se administró Acetilcolina (Ach), la cual estimula la síntesis de ON y tiene como efecto la relajación vascular. Entonces, una inhibición de la relajación implicaría una inhibición de la síntesis de ON.

Como se representa en la Figura 2-8, para su grupo control, después de administrar la Ach se redujo la contracción previamente inducida por Phe, manteniendo solamente un 10% de la misma. Posteriormente se pretrataron los anillos con AP-Cav (8 $\mu$ M), y al aplicar el tratamiento con Phe y Ach se observó que se inhibió el efecto relajador dependiente del

ON en solo un 4% más que en el control. Lo relevante de este trabajo se observa cuando se da la liberación controlada de la AP-Cav unida a MBs mediante el uso de US, en el cual se obtuvo un efecto inhibitorio de la relajación de un 62%, es decir 58% más si se compara con la AP-Cav libre, demostrando así el efecto potenciador de este sistema.

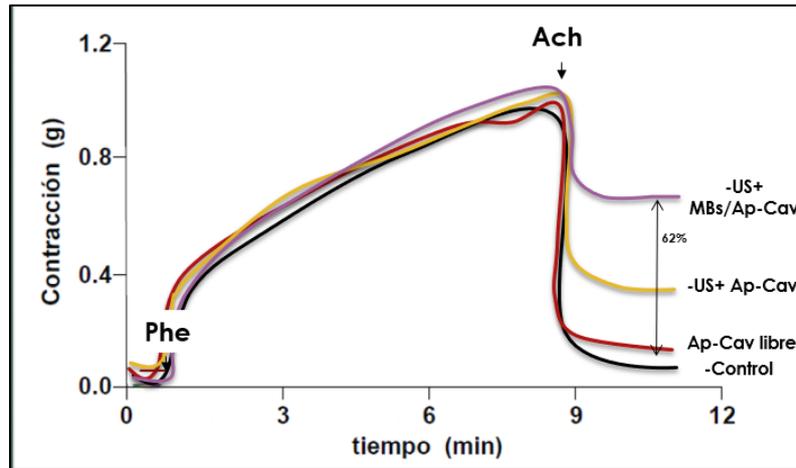


Figura 2-8: Efecto inhibitorio de la relajación inducido por la liberación controlada de AP-Cav. Administración de Fenilefrina (Phe) contrae los anillos aórticos ex vivo, posteriormente la Acetilcolina (Ach) induce la síntesis del ON y la relajación de los anillos. La liberación controlada de la caveolina inhibe este proceso en un 62%.

### **3 Justificación**

En vista de la importancia del óxido nítrico como estimulante de la proliferación y migración de células endoteliales durante la angiogénesis en el crecimiento tumoral, la reducción de su síntesis mediante inhibidores específicos de la eNOS, como la Caveolina-1, es una alternativa para su uso como agente antitumoral. Sin embargo, es necesario asegurar su entrega de manera precisa y eficiente en la zona afectada. Con esta finalidad, el presente trabajo busca comprobar, desde niveles básicos de complejidad, como lo es un estudio *in vitro*, el efecto inhibitorio que tiene la liberación de la Caveolina a partir de un sistema de microburbujas-ultrasonido sobre la reparación del daño endotelial.

## **4 Hipótesis**

La hipótesis de este trabajo es que la liberación de caveolina de microburbujas mediante el ultrasonido podría facilitar su incorporación en las células endotelial potenciando sus efectos inhibitorios sobre la reparación del daño endotelial.

## **5 Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Comparar el efecto de caveolina libre con el de caveolina liberada a partir de un sistema de microburbujas-ultrasonido en el desarrollo de la reparación del daño endotelial.

### **5.2 Objetivos particulares**

1. Sintetizar y caracterizar las microburbujas aniónicas con la capacidad de unión a la Caveolina
2. Caracterizar el efecto inhibitorio de la administración de AP-Cav libre sobre la reparación endotelial *in vitro*
3. Demostrar que liberación controlada de AP-Cav a partir de un sistema de microburbujas-ultrasonido potencia su efecto inhibitorio

## 6 Metodología

Se estableció un protocolo experimental en el que se evalúa el efecto de la liberación controlada de Caveolina sobre la reparación del daño endotelial utilizando un modelo que comprende una monocapa de células endoteliales en cultivo. Para este fin, se utilizaron diversos grupos experimentales, valorando el efecto de cada componente del sistema (Figura 6-1). Inicialmente se trabajó con la AP-Cav libre y se fue aumentando la complejidad del tratamiento para finalmente aplicar el sistema en conjunto.

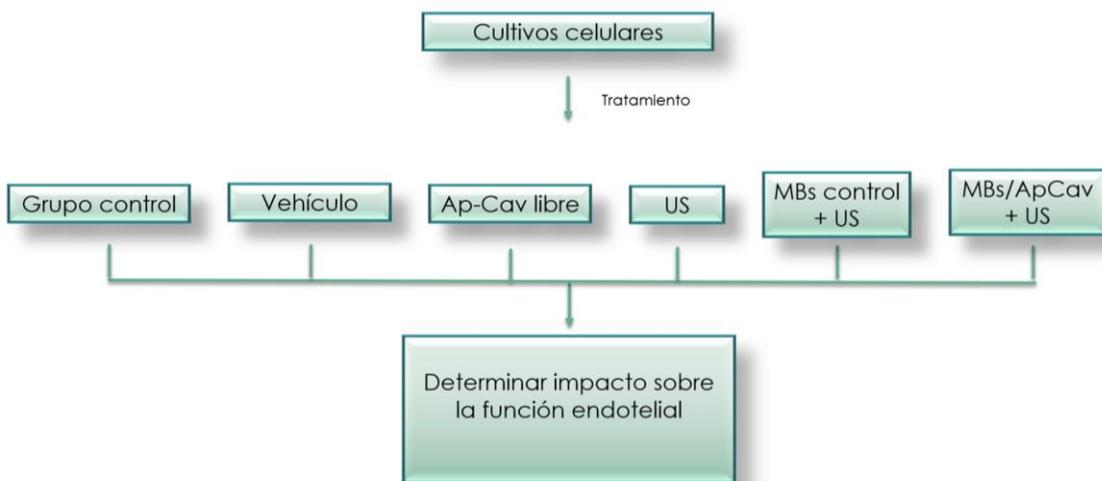


Figura 6-1. Protocolo experimental. Tratamientos diseñados para evaluar el impacto de la liberación controlada de la AP-Cav sobre la función endotelial

### 6.1 Síntesis y caracterización de microburbujas aniónicas

En vista de que el presente trabajo busca evaluar el impacto de un sistema de entrega de microburbujas-ultrasonido, se comenzó por implementar la metodología para la síntesis de microburbujas aniónicas. Con este propósito, se partió de una preparación previamente desarrollada en el laboratorio [33] (Figura 6-4). Esta consistió en una mezcla de los fosfolípidos 1,2- dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(amino(polietilenglicol)-2000) (DSPE-PEG2000) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) y el lípido con carga negativa 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoserina (DPPS) (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) que constituyeron la

envoltura de las microburbujas. Para el núcleo gaseoso se utilizó el perfluoropropano ( $C_3F_8$ ). La síntesis de las microburbujas se dividió en la formación de las películas secas de la mezcla de lípidos, la hidratación de la mezcla y la agitación mecánica (Figura 6-2) que se describen a fondo en las siguientes secciones.

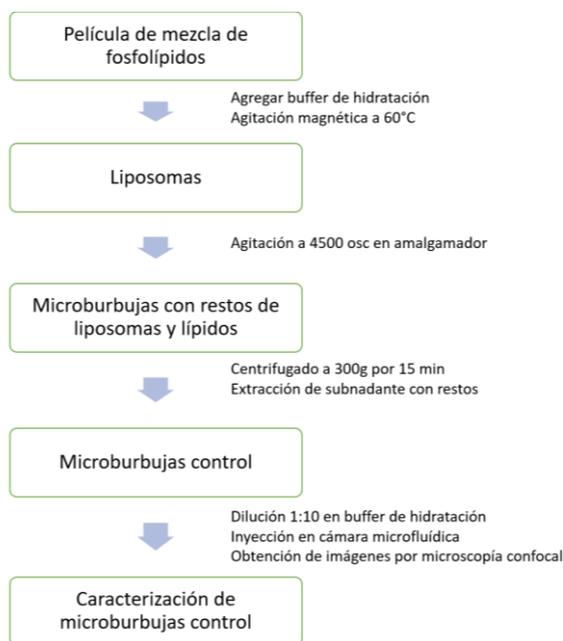


Figura 6-2. Proceso de síntesis de microburbujas por agitación mecánica (amalgamación).

### 6.1.1 Preparación de mezcla y película de lípidos

1. Para tener la mezcla de lípidos DPPC y DSPE-PEG200 con una concentración de 4 mg/ml y una relación molar de 95:5, se pesó de cada lípido 3.3 mg y 0.7 mg respectivamente, en viales ámbar de 20 ml. Cada uno se disolvió en 100  $\mu$ l de cloroformo.
2. Adicionalmente, en un tercer vial se pesaron 0.6 mg de DPPS y se disolvieron en 100  $\mu$ l de cloroformo:metanol (80:20).
3. Se realizó la mezcla de todas las especies de fosfolípidos. Primero, se añadió la solución de DSPE-PEG200 a la de DPPC y posteriormente se sometió a agitación de vórtice para homogeneizar la mezcla. Finalmente se agregó la solución de DPPS y se repitió la agitación de vórtice.
4. Se evaporó el solvente de la mezcla utilizando una corriente de nitrógeno en agitación magnética constante. Con lo anterior se obtuvo en el fondo del vial una película delgada de la mezcla de fosfolípidos.

5. Se colocó el vial parcialmente cerrado en un desecador al vacío durante 2 horas para eliminar totalmente los restos de los solventes utilizados.
6. En caso de que las películas no se utilizaran inmediatamente, los viales se cerraron, se sellaron y se les inyectó una atmósfera de nitrógeno para evitar su oxidación y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **6.1.2 Hidratación de la mezcla y formación de liposomas multilamelares**

1. Una vez que se tiene la película de fosfolípidos lista para usarse, se hidrató con 1 ml de buffer de hidratación compuesto por buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4):glicerol:propilenglicol (80:10:10 v/v) para tener una concentración final de fosfolípidos de 4.6 mg/ml.
2. La mezcla hidratada se sometió a agitación magnética constante a 450 rpm a una temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  por 20 min, para obtener una suspensión de liposomas multilamelares.
3. Después, se colocaron 500  $\mu\text{l}$  de la suspensión de liposomas obtenida en un vial ámbar de 1.5 ml (PTFE/Silicone septum), se selló con Parafilm para evitar la entrada o salida de gases y se le inyectó vacío durante 2 min para eliminar el oxígeno. Finalmente se sustituyó la atmósfera con el gas  $\text{C}_3\text{F}_8$  inyectándolo durante 5 min a una presión de 5 psi.
4. El vial con la suspensión de liposomas con atmosfera de  $\text{C}_3\text{F}_8$  resultante se agitó mecánicamente por 46 segundos a 4500 osc/s en un amalgamador (Ultramat S, Effingham, Ill, USA), obteniendo así las microburbujas.

### **6.1.3 Lavados y recuperación de microburbujas aniónicas**

Para poder utilizar las microburbujas, una vez sintetizadas deben ser sometidas a un proceso de lavados por centrifugación para eliminar el exceso de liposomas y de fosfolípidos que no lograron formar microburbujas, para esto se realizó el siguiente protocolo experimental:

1. Se liberó el exceso de  $C_3F_8$  del vial en el que se encuentran la suspensión de microburbujas y estas se extrajeron utilizando una jeringa que contiene 500  $\mu$ l de buffer de hidratación obteniendo un volumen total de  $\sim 1000 \mu$ l.
2. Se centrifugaron las microburbujas a 300 g por 15 min (Legend Micro 21R, Centrifuge).
3. Con lo anterior, las microburbujas quedan flotando en la superficie del tubo formando una capa de espuma densa y compacta de color blanco. Con una jeringa se retiró el subnadante (líquido inferior) que contiene los restos de liposomas y lípidos no incorporados.
4. Posteriormente, las microburbujas contenidas en cada tubo fueron resuspendidas nuevamente en 200  $\mu$ l de buffer de hidratación y agitadas manualmente hasta observar una solución completamente lechosa.
5. Se repiten los pasos 2 y 3.
6. Las microburbujas restantes se resuspendieron en 600  $\mu$ l de buffer de hidratación, listas para su caracterización y uso.

#### **6.1.4 Caracterización de microburbujas aniónicas**

Una vez sintetizadas las microburbujas aniónicas o control, fue necesario llevar a cabo su caracterización y cuantificación mediante microscopía confocal. Para poder visualizarlas se utilizaron cámaras microfluídicas de PDMS con una geometría de prisma rectangular ( $1 \times 1 \times 0.02 \text{ mm}^3$ ). Dichas cámaras fueron fabricadas mediante litografía suave. El procedimiento para visualizar las microburbujas dentro de la cámara microfluídica y analizar su distribución de tamaños, se realizó como sigue:

1. Una muestra de microburbujas se diluyó en buffer de hidratación a una relación 1:10.
2. Posteriormente, se inyectaron 20  $\mu$ l de esta dilución en la cámara microfluídica utilizando una punta de pipeta acoplada a una cánula.
3. La cámara microfluídica se llevó a un microscopio confocal (Leica TCS SP5, Germany), se tomaron imágenes a un aumento de 630x y un zoom digital extra de 3x.
4. Tres muestras independientes de microburbujas fueron analizadas, de cada muestra se analizaron 3 cámaras y de cada cámara se adquirieron 9 imágenes.

5. Para obtener la distribución de tamaños y cantidad de microburbujas presentes en la dilución, se analizaron las imágenes utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MA, USA) y el histograma de distribución fue graficado mediante el software GraphPad (San Diego California USA).

## **6.2 Síntesis y caracterización de microburbujas con AP-Cav**

### **6.2.1 Incubación de microburbujas aniónicas con AP-Cav**

Después de sintetizar y caracterizar las microburbujas aniónicas o control, fue posible implementar la técnica para unir las al péptido AP-Cav. En vista de que las microburbujas sintetizadas cuentan con un lípido de carga negativa y el AP-Cav es de carga positiva, para lograr la unión del péptido solamente se requirió de la incubación de ambas partes y una serie de lavados como se describe a continuación:

1.  $5 \times 10^8$  microburbujas control se incubaron con 40  $\mu$ l de AP-Cav (2 mg/ml en acetoneitrilo:agua, 50:50) por 30 min a temperatura ambiente con rotación lenta y constante.
2. Posterior a los 30 min de incubación, se realizaron dos lavados con centrifugación a 300 g por 3 min para eliminar el subnadrante con el exceso de AP-Cav que no fue incorporada.
3. Finalmente, las microburbujas con AP-Cav unido fueron resuspendidas en 30  $\mu$ l de buffer de hidratación listas para su caracterización y uso.

### **6.2.2 Cuantificación de microburbujas con AP-Cav y distribución de tamaños**

Para determinar la cantidad de microburbujas con AP-Cav unida recuperadas tras el periodo de incubación y determinar la distribución de las mismas, se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en la sección 6.1.4.

### **6.2.3 Curva estándar de AP-Cav**

Para estimar la cantidad de AP-Cav unida a las microburbujas o eficiencia de unión, se utilizó el kit para la determinación de proteína con el reactivo ácido biciconínico (Kit BCA

protein Assay, 22235, Thermo scientific), con el fin de realizar una curva estándar de AP-Cav que permita establecer un valor de absorbancia para cada concentración del péptido:

1. Se generó una serie de diluciones sucesivas del péptido AP-Cav con concentraciones de 0 a 1 mg/ml.
2. De cada dilución, se colocaron por triplicado 10  $\mu$ l por pozo en una placa de 96 pozos. Como control se utilizó agua pura.
3. Se realizó la preparación del reactivo de trabajo de BCA para la cuantificación de proteína mezclando 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B, dando lugar a una solución verde.
4. Se agregaron 200  $\mu$ l del reactivo de trabajo a los pozos donde se encuentran las diferentes diluciones.
5. La placa con las diferentes diluciones se incubó a 37 °C por 30 min. Al final de la incubación se observó un viraje de verde a violeta según la concentración de proteína.
6. Finalmente, se determinó la absorbancia de cada una de las muestras en un espectrofotómetro de placa (Elx800, Biotek) a 570 nm.
7. De acuerdo con los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración, se generó la curva estándar del péptido AP-Cav.

#### **6.2.4 Eficiencia de unión de AP-Cav a las microburbujas**

Una vez diseñada la curva estándar de AP-Cav, fue posible cuantificar la cantidad de péptido en muestras problema cuya concentración era desconocida con la técnica de BCA interpolando el valor de absorbancia a 570 nm obtenido con la curva. Con base en este principio, se efectuó la técnica que se describe a continuación para cuantificar la cantidad de AP-Cav unida a las microburbujas.

1. Las microburbujas con AP-Cav obtenidas en una suspensión de 30  $\mu$ l en la sección 6.4 fueron expuestas a pulsos de ultrasonido para inducir la liberación del péptido (1 MHz, 50 % ciclo de trabajo, 1 min, 3 W/cm<sup>2</sup>) utilizando el arreglo experimental que se describe más adelante. Como control, se aplicaron las mismas condiciones de ultrasonido a una suspensión de microburbujas control con la misma concentración de las microburbujas con AP-Cav.

2. Se realizó la cuantificación de proteína siguiendo los pasos 2 a 6 de la sección 6.2.3. El valor de absorbancia obtenido fue interpolado en la curva de calibración estándar para determinar la cantidad de AP-Cav unida a las microburbujas.
3. Finalmente, se determinó la eficiencia de unión utilizando la siguiente relación:

$$Eficiencia (\%) = \frac{Ap - Cav liberada}{Ap - Cav inicial} * 100 \quad (1)$$

Donde AP-Cav *liberada* representa la concentración de AP-Cav liberada por los pulsos de ultrasonido (mg/ml) y AP-Cav *inicial* la concentración de AP-Cav inicial (mg/ml).

### 6.3 Arreglo experimental de ultrasonido

Con lo descrito en la sección anterior, se estableció el proceso para la síntesis de microburbujas control y microburbujas cargadas con AP-Cav, sin embargo, para implementar el sistema de entrega, se requiere también establecer las condiciones de los pulsos de Ultrasonido que serán utilizados para liberar a la AP-Cav. Por este motivo, se comenzó la implementación del sistema con un arreglo experimental de ultrasonido previamente utilizado en el laboratorio [29], el cual, consiste en el uso de un equipo comercial de ultrasonido (Intelect Mobile Ultrasound System, modelo 2776) que contiene un transductor de ultrasonido con una superficie de 5 cm<sup>2</sup>.

Tal como se aprecia en la Figura 6-3, el transductor fue colocado en una apertura en la parte inferior de una caja de plástico, cuyas medidas son 17 cm x 25 x 15 cm. Para emplear el arreglo, se añadió un volumen de agua a 37°C suficiente para mantener una altura de 1 cm con respecto al transductor. La muestra para tratar se coloca en contacto con el agua sobre el transductor y se establecen las condiciones de ciclo de trabajo, intensidad, frecuencia y tiempo del pulso de ultrasonido de acuerdo con el ensayo en cuestión.

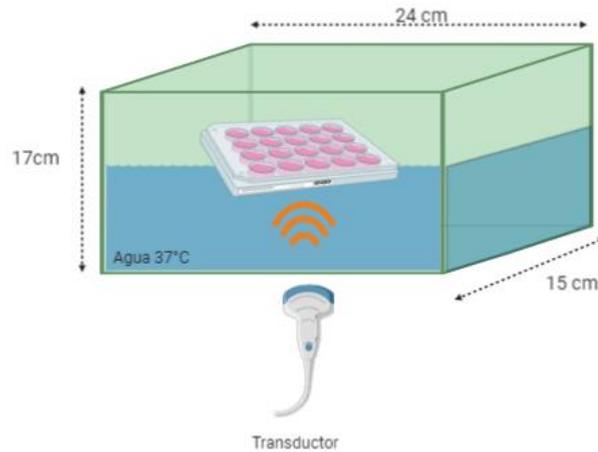


Figura 6-3. Arreglo experimental de ultrasonido para cultivos celulares.

## 6.4 Cultivos celulares

Para evaluar el impacto de los distintos tratamientos sobre la función endotelial, se seleccionó la línea de células endoteliales bEnd.3 (ATCC®), procedente de microvasculatura de corteza cerebral de ratón. Estas, se cultivaron en medio DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin), en una atmósfera controlada y humidificada de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células se cultivaron en frascos T-25 hasta alcanzar un ~ 95% de confluencia, para sus consecuentes resiembras utilizando Tripsina 0.25% (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Se trabajó con células en cultivo desde el pasaje 10 hasta el 30.

### 6.4.1 Curva control de crecimiento celular

Con el fin de llevar un control sobre el número de células respecto al tiempo que crecían en placas de 24 pozos, que es donde se aplican los tratamientos, primero se realizó una curva control de crecimiento celular como se describe a continuación:

1. A partir del cultivo de células bEnd.3 en frascos T-25, se sembró un inóculo de 50,000 células en placa de 24 pozos.
2. Se incubaron por 24, 48, 72 y 96h, sembrando por triplicado y con pasajes distintos para cada tiempo de incubación.

3. Una vez pasado este tiempo, se preparó una solución del marcador fluorescente Hoechst 33342 (Ex/Em = 350 nm/461 nm), el cual es afín al material genético y tiñe los núcleos celulares, en una dilución de 1:1000.
4. Los cultivos celulares se incubaron con el fluoróforo por 20 minutos en oscuridad a 37°C.
5. Se observaron los cultivos con un objetivo de 10x en un microscopio de fluorescencia y se adquieren las imágenes de 1,024 x 1024 pixeles.
6. Después de obtener las imágenes, se cuantificó el número de células teñidas con el software ImageJ y se graficó el promedio de células obtenidas para cada tiempo de incubación.

#### 6.4.2 Viabilidad celular

La viabilidad de los cultivos celulares se monitoreó con el empleo del marcador Homodimero-1 de Etidio rojo fluorescente (Ex/Em=495nm/635 nm) que no puede permea a través de la membrana plasmática y solo tiñe a células que han perdido la integridad de la membrana plasmática o células que se encuentran muertas. Con este ensayo rápido, aplicado en conjunto con el fluoróforo Hoechst, permite discernir a las células vivas de las muertas. Se obtuvieron imágenes de los cultivos por microscopía de fluorescencia como se describe en la sección 6.1.1 y se evaluó la viabilidad con la siguiente relación:

$$Células\ vivas\ (\%) = \frac{Células\ totales - Células\ muertas}{Células\ totales} \times 100 \quad (2)$$

#### 6.5 Efecto inhibitorio de la reparación endotelial inducido por AP-Cav

Dado que las condiciones del crecimiento de las células bEnd.3 fueron establecidas en la sección anterior, la siguiente etapa consistió en implementar el ensayo de reparación de la herida (Wound healing) para evaluar la reparación del daño celular por las células endoteliales, o reparación endotelial. Este, es un ensayo estándar utilizado *in vitro* para estudiar el movimiento coordinado de una población celular en dos dimensiones simulando al proceso de angiogénesis. Como se observa en la Figura 6-2, llevar a cabo

esta prueba permite evaluar apropiadamente la función celular, pues las células endoteliales mediante los procesos de migración y proliferación celular sellan una grieta o canal creada mecánicamente en la monocapa.



Figura 6-4. Esquema general del ensayo de reparación de la herida.

Un parámetro que indicaría si la función endotelial se está viendo afectada ante los distintos tratamientos, es la velocidad de reparación, pues si esta disminuye, significa que la migración o proliferación celular está siendo alterada. De esta forma, para estandarizar el protocolo y evaluar si la AP-Cav tiene un efecto sobre la función endotelial se efectuó la metodología descrita a continuación:

### 6.5.1 Ensayo de reparación de la herida (Wound healing)

Para llevar a cabo el ensayo de reparación de la herida, fue necesario tener una monocapa de células endoteliales bEnd.3 con una confluencia del ~90%, que de acuerdo con la curva obtenida en la sección 6.4.1, esta se obtiene a las 72 h de incubación con una siembra inicial de 50,000 células en placas de 24 pozos. Una vez establecido este parámetro, se estableció el ensayo.

1. En condiciones de esterilidad, con una puntilla de micropipeta de 200  $\mu$ l se presionó firmemente sobre las células en un extremo del pozo, y suavemente se hizo una estría vertical a lo largo de la monocapa, pasando por el centro del pozo, como se muestra en el punto 2 de la figura 16.
2. Se hizo un lavado con PBS a 37°C y se añadieron 350  $\mu$ l de medio DMEM con suero al 1% y antibióticos al 1%.
3. Se colocan marcas de referencia por afuera de la placa para captar fotografías del mismo campo.

4. Incubar a 37°C en una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Con el uso de un microscopio invertido a un aumento total de 40x con una cámara incorporada se tomaron fotografías de la estría en la monocapa a las 0, 5, 10, 20 y 25 h.

### **6.5.2 Procesado de imágenes para determinar el área de la estría**

Para delimitar el área de la estría con el borde o las células fue necesario llevar a cabo un procesado de imágenes basado en la metodología de un estudio anterior para llevar a cabo la correcta medición del cambio del área en el tiempo durante el estudio de reparación de la herida [28].

1. Las imágenes obtenidas a las diferentes horas fueron procesadas con el software ImageJ. Primero se transformó la imagen a 8 bits.
2. Se aplicó la función de encontrar bordes (find edges).
3. Se aumentó el contraste y se normalizó con una saturación del 10%.
4. Se aplicó el filtro de media o promedio con un radio de 22 píxeles.
5. Se determinó un umbral apropiado para binarizar la imagen que permita discernir apropiadamente entre la zona de la estría y la estría.
6. Se invirtió la imagen para que la estría quede en color negro y el borde en color blanco.
7. Con la función de analizar partículas (analyze particles) se obtuvo el área de la estría y se delimitaron los bordes de esta con la opción de mostrar contornos (show outlines). Para descartar partículas pequeñas detectadas por la función se seleccionó un umbral mínimo de 50,000 píxeles cuadrados.
8. Para transformar el área obtenida en píxeles cuadrados a mm<sup>2</sup> se empleó una métrica de 1.00 mm que permita determinar la cantidad de píxeles correspondientes a dada longitud en mm.

### **6.5.3 Determinación de la velocidad de reparación**

Una vez procesadas las imágenes de la estría, se tuvo determinada el área correspondiente a las diferentes horas. Sin embargo, un valor clave para llevar a cabo comparaciones fue la velocidad en que las células en conjunto reparar el daño endotelial y, sobre todo, cómo este parámetro se ve afectado posteriormente al aplicar los distintos tratamientos. Por ello,

se trabajó con la información obtenida para calcular la velocidad de reparación de la siguiente manera:

1. Se graficó el área respecto al tiempo y se determinó la función de la recta, donde 'y' corresponde al valor del área, 'm' indica la tasa de cambio del área con respecto al tiempo, 'x' el tiempo y 'b' la intersección en 'y'

$$y = mx + b \quad (3)$$

2. Además, se determinó el área (A) de la estría considerando las dimensiones de ancho (w) y largo (l):

$$A = w \times l \quad (4)$$

3. Si la pendiente (m) indica la tasa de cambio del área con respecto al tiempo, se puede trabajar con la siguiente fórmula:

$$m = \frac{dA}{dt} \quad (5)$$

4. Asumiendo que las células no migran hacia la estría desde los extremos, la longitud (l) se mantiene constante en el tiempo:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{l \times dw}{dt} \quad (6)$$

5. Si el ancho se cierra debido a la migración de las células por ambos lados de la estría, entonces el ancho se cierra al doble de la velocidad de reparación:

$$\frac{dw}{dt} = 2 \times v_{reparación} \quad (7)$$

6. Sustituyendo, se obtiene que la velocidad de reparación se puede determinar con la siguiente ecuación:

$$v_{reparación} = \frac{|m|}{2 \times l} \quad (8)$$

## 6.6 Efecto de la AP-Cav sobre la velocidad de reparación

Para evaluar el efecto inhibitorio de AP-Cav (AP-Cav, ALX-153-064, Enzo Life Sciences) sobre la función endotelial se aplicaron distintas concentraciones del péptido con la intención de obtener una curva dosis respuesta sobre la velocidad de reparación. Dichos tratamientos se aplicaron inmediatamente después de crear la estría sobre la monocapa de células endoteliales y lavar con PBS (paso 1 y 2 de la sección 6.5.1). Para ello se partió de los siguientes grupos experimentales:

- Grupo control. Cultivo celular estriado sin ningún tratamiento.
- Grupo Vehículo. Cultivo celular estriado con 8.31  $\mu$ l de acetonitrilo: agua (50:50).
- Grupo AP-Cav (10  $\mu$ M): Cultivo celular estriado con AP-Cav a concentración final de 10  $\mu$ M.
- Grupo AP-Cav (5  $\mu$ M): Cultivo celular estriado con AP-Cav a concentración final de 5  $\mu$ M.
- Grupo AP-Cav (1  $\mu$ M): Cultivo celular estriado con AP-Cav a concentración final de 1  $\mu$ M.

Se determinó la velocidad de reparación de cada tratamiento con base en lo descrito en las secciones anteriores. Además, se obtuvo el porcentaje de inhibición de la reparación endotelial por los distintos tratamientos en comparación con el grupo control de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{V_{ctrl} - V_{trat}}{V_{ctrl}} \times 100 \quad (9)$$

Donde  $V_{ctrl}$  corresponde a la velocidad de reparación del grupo control y  $V_{Trat}$  a la velocidad de reparación de los distintos tratamientos.

## 6.7 Efecto de la liberación controlada de AP-Cav unido a las microburbujas sobre la velocidad de reparación

Una vez caracterizado el sistema de microburbujas-ultrasonido para liberar a la AP-Cav y valorado el efecto inhibitorio de la AP-Cav libre sobre la función endotelial con la técnica de reparación de la herida, se establecieron los últimos tratamientos, para finalmente

evaluar si se potencia el efecto inhibitorio de la AP-Cav utilizando concentraciones menores del péptido. Con este fin, se establecieron los siguientes tratamientos:

- Grupo control. Cultivo celular estriado sin ningún tratamiento.
- Grupo US. Cultivo celular estriado sometido a el US con una intensidad de 2 W/cm<sup>2</sup>, frecuencia 1 MHz, ciclo de trabajo del 10% por 30 s (condiciones para liberar a la AP-Cav y que no dañan la integridad de los cultivos celulares [29,36]).
- Grupo US + MBs control. Cultivo celular estriado con 1.68 x 10<sup>6</sup> MBs aniónicas sometido a US.
- Grupo US + MBs unidas a AP-Cav. Cultivo celular estriado con 1.68 x 10<sup>6</sup> MBs unidas a AP-Cav sometido a US.

De manera análoga a la sección 6.6, todos los tratamientos se aplicaron inmediatamente después de realizar la estría sobre la monocapa de células endoteliales y lavar con PBS (paso 1 y 2 de la sección 6.5.1). Posterior a esto, se capturaron las imágenes y se procesaron para obtener la velocidad de reparación endotelial ante la aplicación de los distintos tratamientos.

## 7 Resultados

### 7.1 Caracterización de las microburbujas

Tras sintetizar las microburbujas control, se llevó a cabo la cuantificación de estas en tres muestras independientes y se obtuvo una concentración promedio de  $2.58 \pm 0.5 \times 10^{10}$  MBs/ml. De estas, se utilizó una muestra de  $3.03 \times 10^8$  microburbujas para incubarse con AP-Cav y se recuperó un total de  $6.65 \pm 0.01 \times 10^7$  microburbujas que se resuspendieron en 30  $\mu$ l de buffer de hidratación, es decir, que se perdió un orden de magnitud del total de microburbujas añadidas durante el proceso de incubación con la AP-Cav y los lavados.

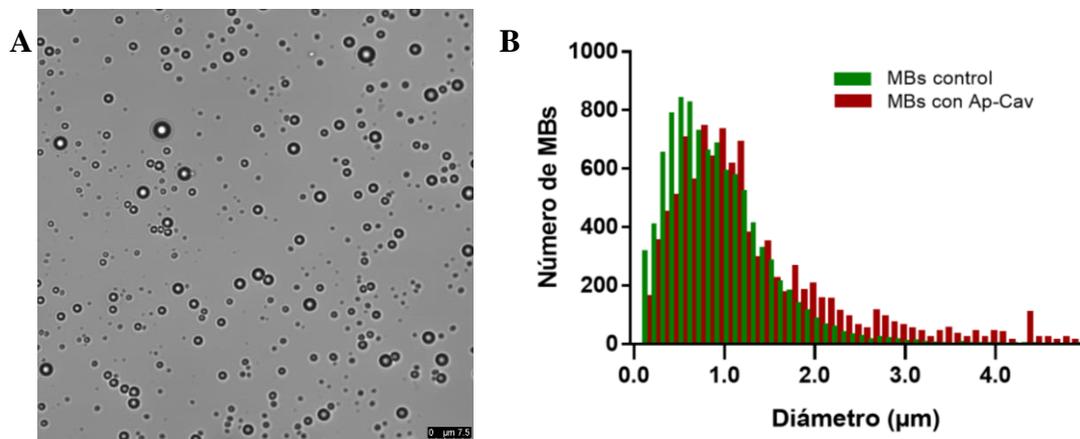


Figura 7-1. Distribución de tamaños de microburbujas con AP-Cav unido. A) Imagen confocal representativa de una muestra de microburbujas con AP-Cav unido a una dilución 1:10. La barra representa una escala de 7.5  $\mu$ m. B) Histogramas de distribución de tamaños para una población de 9000 microburbujas control y unidas a AP-Cav.

Las microburbujas obtenidas con AP-Cav unido mostraron una forma esférica y sin aglomeraciones (Figura 7-1 A), características similares a las microburbujas control. Sin embargo, al obtener los histogramas de distribución (Figura 7-1-B) se aprecia que hay una diferencia en el tamaño promedio de ambos tipos de microburbujas. En cada histograma se incluye una muestra de 9000 microburbujas provenientes de 3 muestras independientes. Para las microburbujas control se obtuvo un rango de tamaños que osciló desde los 0.2 hasta los 4  $\mu$ m, con un diámetro promedio de  $0.91 \pm 0.1 \mu$ m. Mientras que en el diámetro promedio de las microburbujas unidas a AP-Cav se observó un ligero incremento, pues su rango de tamaños osciló desde los 0.2 hasta los 5  $\mu$ m con un diámetro promedio de  $1.22 \pm 0.05 \mu$ m.

En la Figura 7-2, se observa que la que curva de calibración estándar de AP-Cav obtenida con la técnica de BCA a concentraciones de 0 a 1 mg/ml mostró un crecimiento lineal dependiente de la concentración (círculos negros) para tres repeticiones independientes. El valor interpolado de la cantidad de AP-Cav detectada en la suspensión de microburbujas correspondió a 0.29 mg del péptido (círculo rojo), lo que equivale a una capacidad de carga 0.13 pg/microburbuja y una eficiencia de unión del 10.17%.

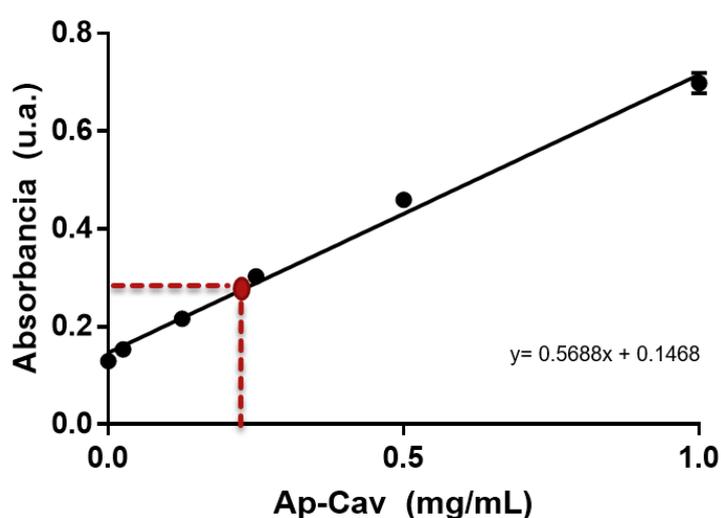
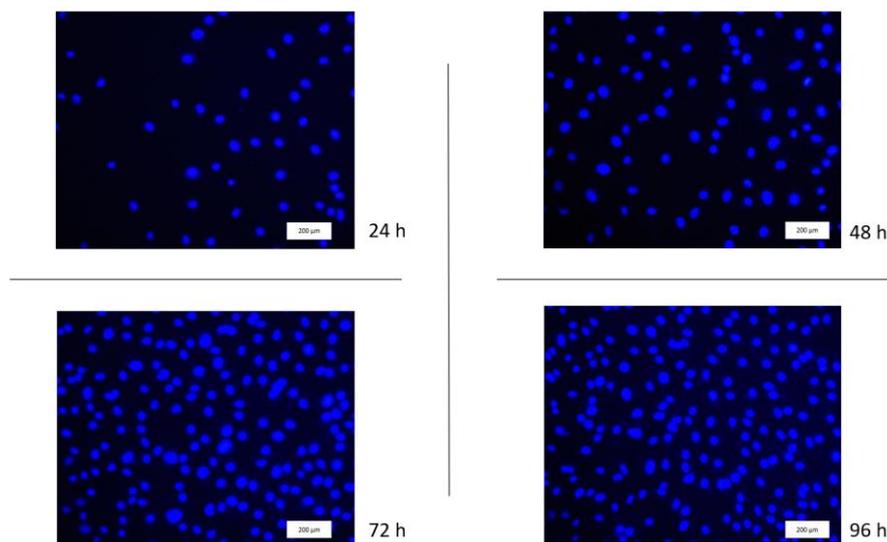


Figura 7-2. Eficiencia de unión de AP-Cav a microburbujas. Curva de calibración estándar de AP-Cav (círculos negros). La línea continua negra representa el ajuste lineal con una  $r^2=0.9981$ . El punto rojo representa la estimación de la concentración de AP-Cav unida a las microburbujas por medio de interpolación. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 3 experimentos independientes.

## 7.2 Curva de crecimiento y formación de monocapa de las células bEnd.3

El endotelio, como se menciona en la introducción, está conformado por una monocapa de células endoteliales. Debido a que el presente es un estudio *in vitro*, es crucial establecer las condiciones y tiempos para obtener una monocapa de las células bEnd.3 en cultivo, con la finalidad de representar de mejor manera lo que pudiese ocurrir en los capilares o vasos sanguíneos de un organismo vivo. Por esta razón, se monitoreó por microscopía de

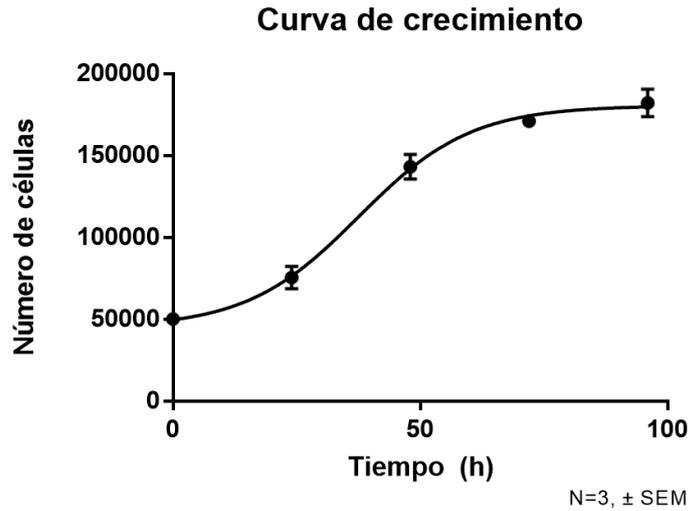
fluorescencia el cultivo hasta 96 horas después de la siembra utilizando el fluoróforo Hoechst 33342 con el fin de detectar el tiempo en el cual se forma una monocapa de células endoteliales (Figura 7-3).



*Figura 7-3. Tinción de Hoechst para núcleos celulares. Imágenes representativas de la cantidad de núcleos presentes a las 24, 48, 72 y 96 horas utilizando el marcador Hoechst 3342 en cultivos de células bEnd.*

Si bien, de manera cualitativa las imágenes de la Figura 7-3 pudiesen indicar que la formación de la monocapa, es decir, que las células cubrían prácticamente toda la superficie de la placa de cultivo o que están en confluencia, se apreció a las 72 h, un análisis más preciso se llevó a cabo con el Software ImageJ para obtener la curva de crecimiento celular que se muestra en la Figura 7-4. Esta gráfica permite observar que, en las condiciones establecidas para los cultivos, el crecimiento celular de las células bEnd.3 se adapta a una curva logística o sigmoide, la cual tiene una capacidad de carga de  $\sim 180,000$  células. Este valor corresponde al tamaño máximo de población que el ambiente puede soportar en un periodo determinado debido a las condiciones espaciales, de nutrientes, etc. [37].

De esta manera, el análisis de la curva de crecimiento permite confirmar lo observado cualitativamente con las imágenes de la Figura 7-3, ya que a las 72 h de incubación las células se encontraron a  $\sim 90\%$  de confluencia.



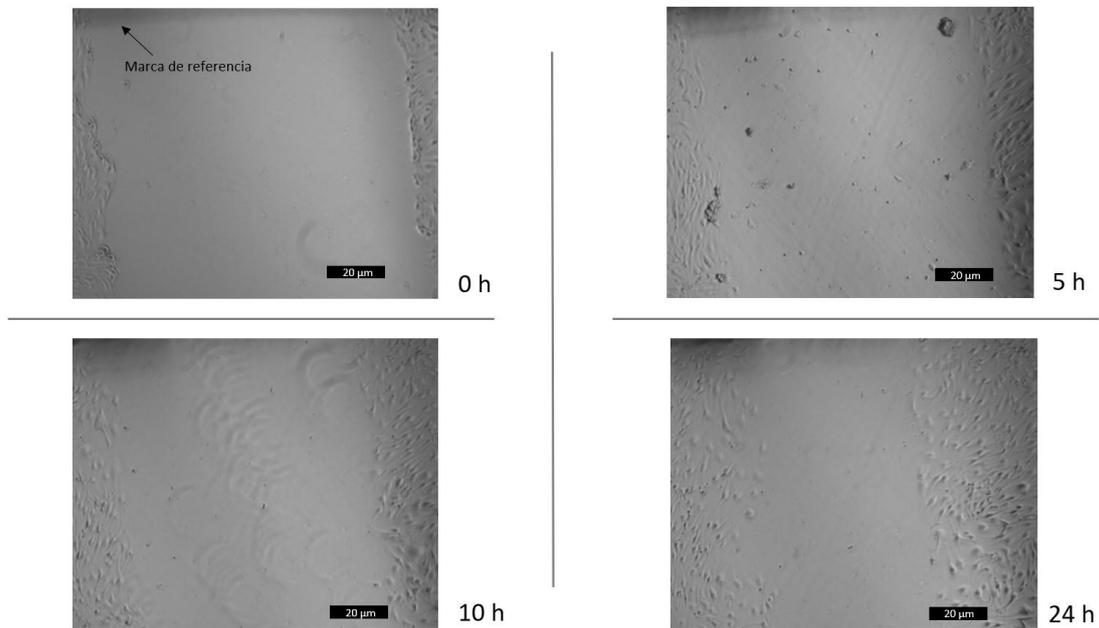
*Figura 7-4. Curva de crecimiento de las células bEnd.3. Resultados de la cuantificación del crecimiento de las células bEnd.3. Se tomaron 10 fotografías para cada medición. Se muestra el promedio ± el error estándar de la media (SEM) de 3 experimentos independientes.*

### **7.3 Ensayo de reparación de la herida para evaluar la función endotelial**

Puesto que las células alcanzaron la confluencia a las 72 h, fue a este tiempo donde se aplicó el ensayo de reparación de la herida para valorar la reparación del daño endotelial. Primero, se caracterizó el ensayo, pues era necesario establecer las condiciones y tiempos a estudiar previo a la aplicación de los tratamientos. Como se aprecia en la Figura 7-5, fue claro que tras generar mecánicamente la estría sobre la monocapa, las células endoteliales mediante migración y en menor medida por proliferación celular, comenzaron a repoblar el espacio vacío conforme pasaban las horas. Sin embargo, visualmente era difícil apreciar y establecer la distancia recorrida por las células en conjunto o en qué porcentaje se vio reducido el área del canal.

El análisis realizando un filtrado de imágenes fue una parte esencial del presente estudio, ya que de este dependía la medición apropiada del área de la estría para poder así, monitorear su cambio respecto al tiempo. Con el software ImageJ se logró estandarizar este procedimiento, pues si bien las imágenes obtenidas en escala de grises (Figura 7-6 A) revelan que, a pesar de que la estría y las células tienen en promedio valores similares de intensidad (de 130 a 150 en la escala de grises), ambas zonas difieren en la variación local de la intensidad de píxeles. Es decir, que el área de la estría presenta una intensidad

continua o lisa con muy poca variación, mientras que cambios abruptos en la intensidad de pixeles se observan en la zona de las células o la región de interfase células-estría.



*Figura 7-5. Reparación del daño endotelial con el ensayo de reparación de la herida por células bEnd.3. Las fotografías obtenidas a las 0, 5, 10 y 24 h permiten observar el movimiento de la población de células endoteliales hacia el espacio afectado con una puntilla de micropipeta.*

Con fundamento en dicha variación, se aplicó la detección de bordes con la intención de crear imágenes que resalten la magnitud de cambios en la intensidad entre pixeles vecinos. De esta forma, la función de detección de bordes les asignó a las zonas con baja variación, en su mayor parte el área de la estría, valores bajos o cercanos a negro, mientras que a las zonas con mayor fluctuación en la intensidad les fueron asignados valores altos o cercanos a blanco (Figura 7-6 B). Aun cuando en la imagen resultante no se observa a detalle esta asignación de valores altos o bajos, un aumento en el contraste posibilitó su apreciación (Figura 7-6 C).

El siguiente objetivo en el procesamiento de imágenes fue reducir la escala de grises a dos únicos valores con la intención de asignar un color negro a la estría y un color blanco a las células o la interfase células-estría, es decir, binarizar la imagen preservando sus propiedades esenciales. Para esto fue necesario aplicar un filtro de media o promedio para llevar todos los pixeles del canal a un valor promedio con sus pixeles vecinos y lo mismo

con los pixeles correspondientes a la zona de las células (Figura 7-6 D). Hecho esto, solamente fue cuestión de aplicar un umbral apropiado para obtener una imagen con color totalmente negro en el canal y blanco en los bordes (Figura 7-6 E).

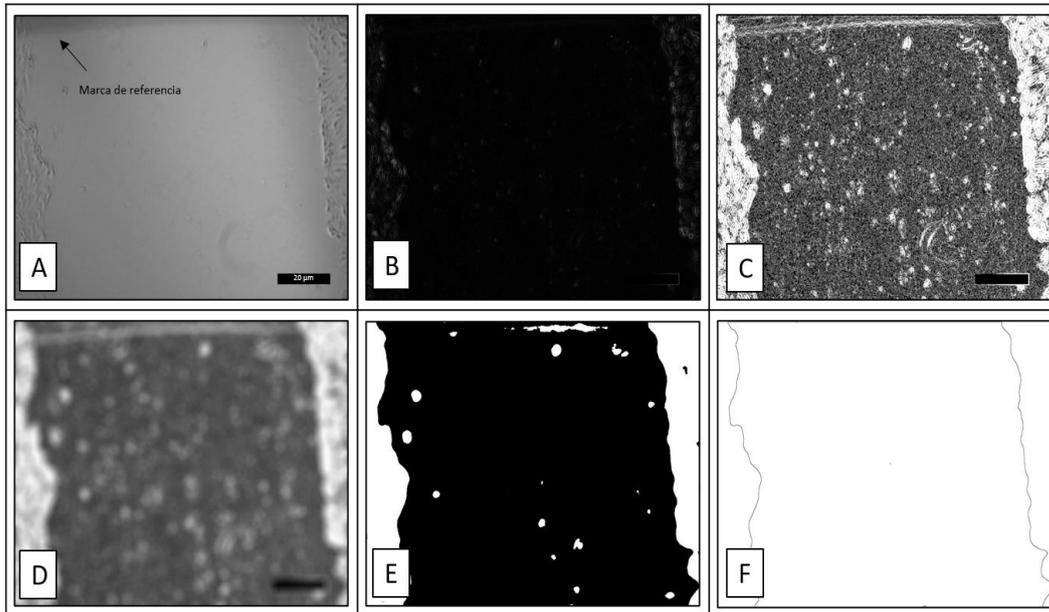
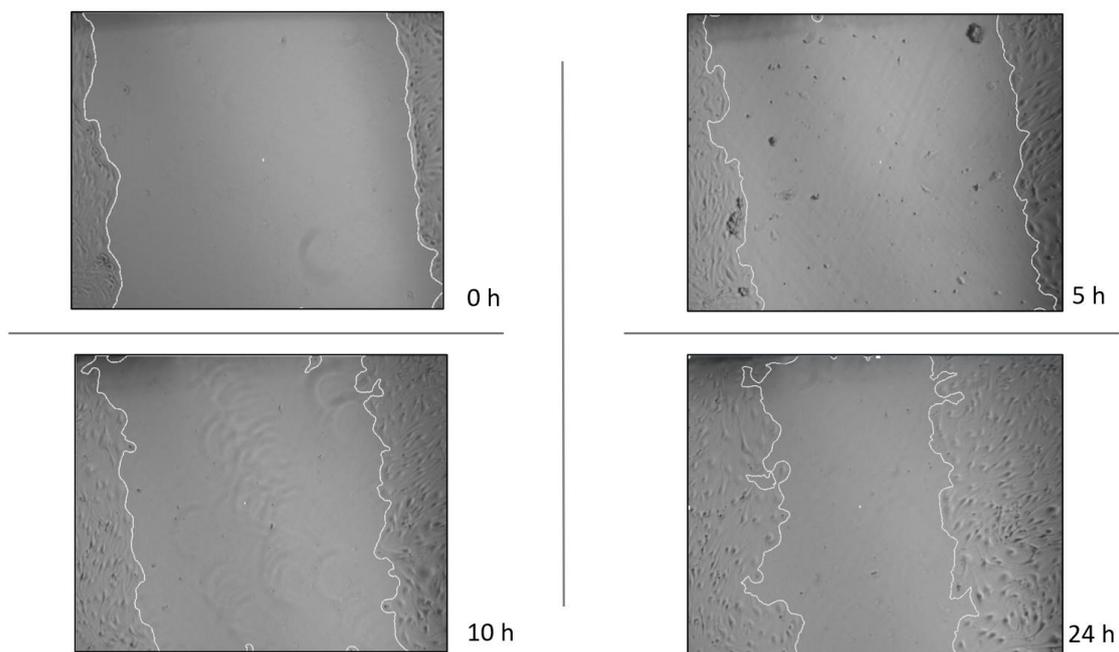


Figura 7-6. Procesado de imágenes para ensayo de reparación de la herida. A la imagen en escala de grises (A) se aplicó la detección de bordes (B), seguido de un aumento de contraste (C) y un filtro de media o promedio (D). Después, se seleccionó manualmente un umbral que permita discernir entre las células y el canal (E) y con la función de analizar partículas se obtiene el borde del canal y el área de este (F). Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ.

Finalmente, la función de analizar partículas (Analyze Particles) de ImageJ permitió obtener el borde de la estría, así como el área de esta (Figura 7-6 F). Tal como se observa en la Figura 7-7, el filtrado funcionó apropiadamente para todas las imágenes obtenidas durante el ensayo de reparación de la herida, de forma que se logró analizar cuantitativamente el fenómeno de reparación endotelial en los cultivos celulares.

Inicialmente, se analizó la reparación endotelial en el grupo control, es decir, llevar a cabo el ensayo sin ningún tipo de tratamiento. Para esto, se tomaron 3 fotografías de distintas zonas de la estría por pozo a las 0, 5, 10 y 24 h. Una vez procesadas las imágenes, se graficó el promedio del área obtenida con respecto al tiempo. Se llevaron a cabo 3 repeticiones del mismo ensayo y las gráficas resultantes para cada uno se observan en la Figura 7-8, donde hay dos puntos a considerar, primero, el comportamiento de la reparación endotelial fue lineal, cada gráfica por separado se ajusta a la ecuación de

regresión lineal o función de la recta (ecuación 3) con un coeficiente de correlación o  $R^2$  de 0.99. Lo anterior indica que el proceso de reparación de la estría por parte de las células bEnd.3 es constante en el tiempo, esto es, no hay periodos donde las células bEnd.3 se desplacen hacia la estría más rápido o lento. Lo segundo a considerar, es que el proceso de reparación es independientemente del área inicial o el tamaño de la estría, la tasa de cambio del área con respecto al tiempo  $m$  (ecuación 4), se mantuvo constante para cada ensayo con un valor promedio de  $0.0175 \pm 0.004 \text{ mm}^2/\text{h}$ .



*Figura 7-7. Imágenes procesadas para el ensayo de reparación de la herida.*

Si bien la pendiente  $m$  ya era un valor que se podía comparar ante la aplicación de los distintos tratamientos, un parámetro más representativo o asimilable al momento de su interpretación, es la velocidad con que las células se desplazan en conjunto hacia la estría en  $\mu\text{m}/\text{h}$ . De esta forma, aplicando las ecuaciones 3 a 8 de la sección 6.5.3, se logró determinar una velocidad de reparación del grupo control de  $8.60 \pm 0.51 \mu\text{m}/\text{h}$  de acuerdo con los 3 ensayos independientes del grupo control.

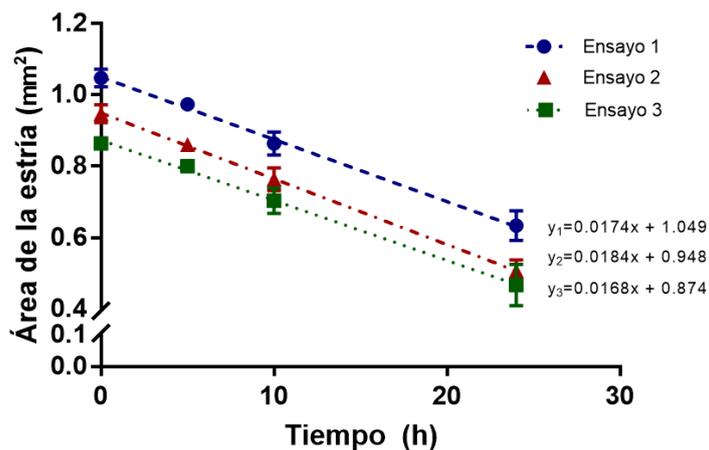


Figura 7-8. Reducción del área de la estría en el tiempo debido a la reparación endotelial. Se muestran tres ensayos independientes del grupo control o sin ningún tratamiento. Se aprecia que la pendiente mostrada en la reparación de la herida por las células bEnd.3 se ajusta a una regresión lineal con  $r^2$  de 0.99 y que la tasa de cambio del área con respecto a tiempo (m) se mantiene constante independientemente del área inicial.

## 7.4 Efecto inhibitorio de la reparación endotelial inducido por AP-Cav

Después de haber establecido el ensayo de reparación de la herida para evaluar la reparación endotelial en cultivos celulares de células bEnd.3 y determinada la velocidad de reparación del grupo control, se procedió a evaluar el efecto del acetonitrilo, que es el solvente en el cual se encuentra disuelta la AP-Cav, sobre este parámetro. Para este tratamiento denominado como Vehículo, se obtuvo una velocidad de reparación de  $7.90 \pm 0.35 \mu\text{m/h}$ , ligeramente menor a la velocidad de  $8.60 \pm 0.52 \mu\text{m/h}$  del grupo control (Figura 7-9).

Tras descartar que la presencia del acetonitrilo tenga un efecto de relevancia sobre la velocidad de reparación, lo siguiente que se efectuó fue evaluar la inhibición de la reparación endotelial por parte de la AP-Cav. Para esto se establecieron tres concentraciones de AP-Cav: 1, 5 y  $10 \mu\text{M}$ . Después de realizar el ensayo de reparación de la herida y procesar las imágenes pertinentes, se observó que la velocidad de reparación endotelial se vio afectada de forma que a mayor concentración de AP-Cav, menor la velocidad de reparación, obteniendo así una curva dosis-respuesta (Figura 7-10). La concentración más baja de AP-Cav ( $1 \mu\text{M}$ ) redujo la velocidad de reparación a  $6.04 \pm$

0.49  $\mu\text{m}/\text{h}$ ; con la AP-Cav (5  $\mu\text{M}$ ) se obtuvo una velocidad de reparación de  $2.41 \pm 0.13$   $\mu\text{m}/\text{h}$ ; por último, la concentración más alta de AP-Cav utilizada (10  $\mu\text{M}$ ) disminuyó casi en su totalidad la velocidad de reparación hasta  $1.07 \pm 0.23$   $\mu\text{m}/\text{h}$ .

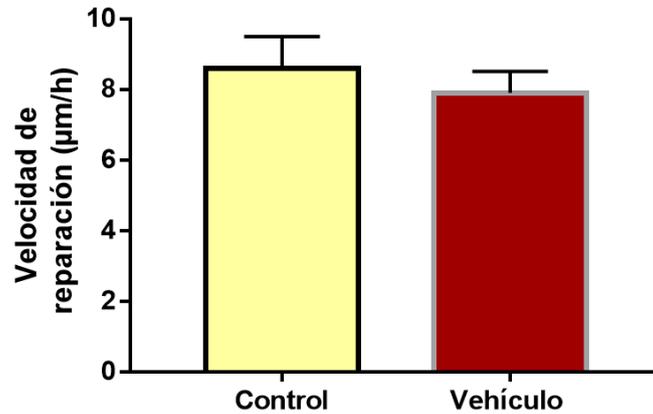


Figura 7-9. Velocidad de reparación del grupo control y el vehículo. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ . No hay diferencia significativa entre ambos grupos ( $P < 0.05$ ).

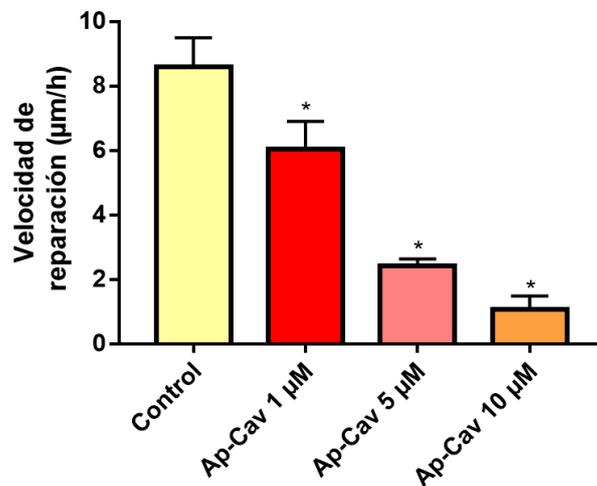


Figura 7-10. Velocidad de reparación ante distintas concentraciones de AP-Cav. Efecto dosis-respuesta de la AP-Cav indica que a mayor concentración de AP-Cav menor es la velocidad de reparación. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ , \* $P < 0.01$  vs control.

Empleando la ecuación 8 para evaluar el porcentaje de inhibición de los tratamientos de Vehículo y las diferentes concentraciones de AP-Cav, se obtuvo que el Vehículo solamente inhibió la reparación en un  $6.74 \pm 3.49$  %. Para las diferentes concentraciones de AP-Cav, el porcentaje de inhibición se vio incrementado conforme se aumentó la

concentración del péptido. Se encontró que 1  $\mu\text{M}$  de AP-Cav tuvo un efecto inhibitorio del  $29.7 \pm 4.35 \%$ ; la AP-Cav a una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , mostró una inhibición sobre la velocidad de reparación del  $72.06 \pm 1.81 \%$ ; por último, el efecto más acentuado se observó con la AP-Cav a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , la cual inhibió la reparación endotelial hasta un  $87.54 \pm 1.90 \%$  (Figura 7-11). Estos resultados, indican que, en efecto, la AP-Cav tiene un impacto sobre la función de las células endoteliales, especialmente sobre la migración celular.

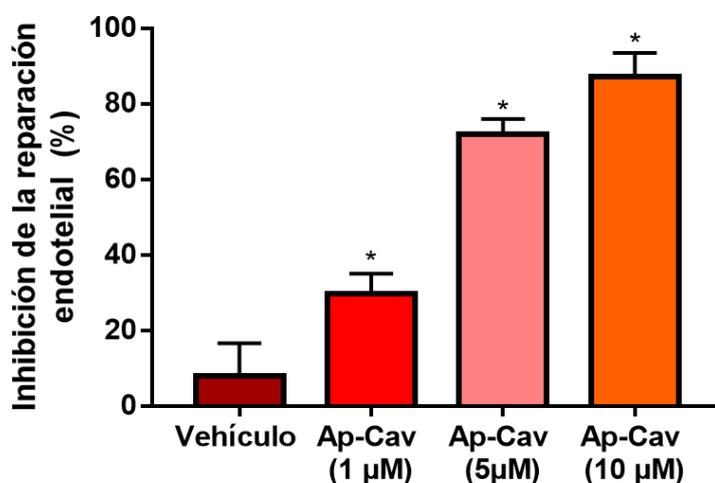


Figura 7-11. Porcentaje de inhibición de la reparación endotelial en comparación con el grupo Control. Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ ,  $*P < 0.01$  vs vehículo.

## 7.5 Viabilidad celular

Para descartar que el efecto observado sobre la reducción de la velocidad de reparación se deba a un efecto de toxicidad, se evaluó la supervivencia o viabilidad celular a las 24 horas de incubación bajo las mismas condiciones de cultivo para el ensayo de reparación de la herida. Como se observa en la Figura 7-12-A, el total de las células presentes se observó de color azul con el fluoróforo Hoechst 33342 y las células muertas de color rojo con la tinción con Homodímero-1 de Etidio rojo fluorescente. La viabilidad se calculó de acuerdo con la ecuación 1, esta se mantuvo en el grupo control en un  $99.43 \pm 0.30 \%$ . Una respuesta similar se observó con las soluciones de AP-Cav a 1 y 5  $\mu\text{M}$ , para las cuales se obtuvo un  $99.08 \pm 0.25 \%$  y  $98.69 \pm 0.17 \%$  de viabilidad celular respectivamente. Sin embargo,

para el tratamiento de AP-Cav 10  $\mu\text{M}$  la viabilidad se vio reducida a un  $88.90 \pm 1.12 \%$  (Figura 7-12, B), lo que indica que a esta concentración se empezaban a mostrar indicios de citotoxicidad por parte del tratamiento. Esto, dejó una ventana de trabajo para las concentraciones de AP-Cav de 1 y 5  $\mu\text{M}$ , donde se observó reducción de la velocidad de reparación sin afectar la viabilidad celular.

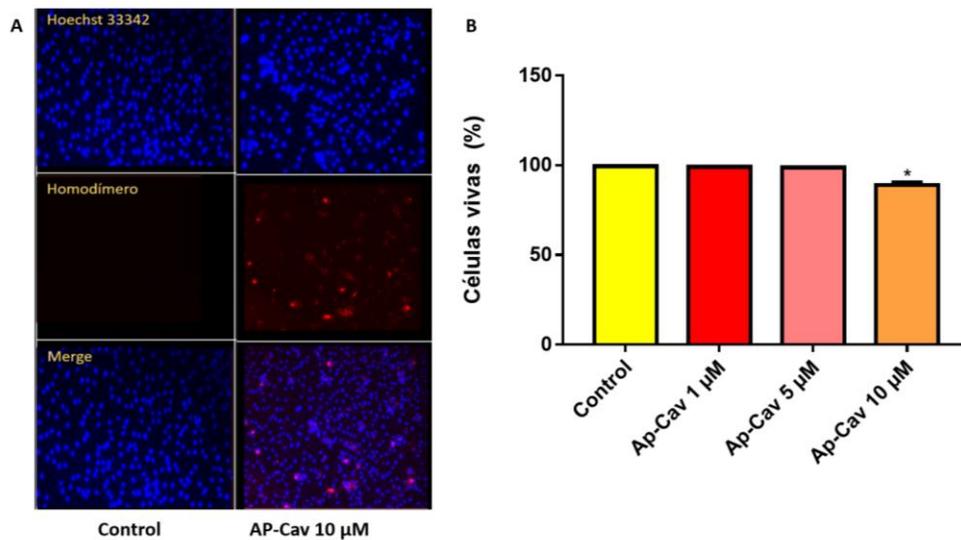


Figura 7-12. Ensayo de viabilidad celular. A) La primera fila muestra la tinción de los núcleos con Hoechst 33342 en color azul, indica el total de células presentes mientras que en la segunda fila se encuentra la tinción con Homodímero-1 de Etidio rojo fluorescente para las células muerta. En la tercera fila se muestra la imagen compuesta por ambas tinciones. B) Porcentaje de células vivas presentes a las 24 horas de incubación con el grupo Control, AP-Cav 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ , \* $P < 0.01$  vs control.

## 7.6 Efecto de la liberación controlada de AP-Cav unido a las microburbujas sobre la reparación endotelial

Una vez que se estableció el efecto inhibitorio de la AP-Cav libre con un comportamiento dosis-respuesta sobre la velocidad de reparación endotelial, con lo que se encontró la ventana de concentraciones de AP-Cav que no causaron citotoxicidad sobre los cultivos celulares y además de que se caracterizaron las microburbujas con AP-Cav unida, finalmente se evaluó el efecto de los tratamientos restantes propuestos en la metodología (Figura 6-1) sobre la velocidad de reparación endotelial, los cuales son: Ultrasonido, Microburbujas control y ultrasonido y Microburbujas con AP-Cav y ultrasonido.

Primero, basado en estudios previamente realizados en el laboratorio, se aplicó el ultrasonido con una intensidad de  $2 \text{ W/cm}^2$ , a una frecuencia 1 MHz y un ciclo de trabajo del 10% por 30 s. Como se observa en la Figura 7-13, para este tratamiento se obtuvo una velocidad de reparación de  $7.92 \pm 0.41 \text{ }\mu\text{m/h}$ , ligeramente menor a la velocidad de  $8.60 \pm 0.51 \text{ }\mu\text{m/h}$  observada en el grupo control. Posteriormente, se añadió una cantidad de  $1.68 \times 10^6$  microburbujas control en conjunto con el ultrasonido y se obtuvo una velocidad de  $7.48 \pm 0.46 \text{ }\mu\text{m/h}$  para este tratamiento. Si bien, estos resultados parecieran revelar que se redujo la velocidad de reparación en comparación con el grupo control, esta reducción no fue estadísticamente significativa, lo que indica que los tratamientos de ultrasonido o ultrasonido más microburbujas control no tuvieron un efecto de relevancia sobre la reparación endotelial.

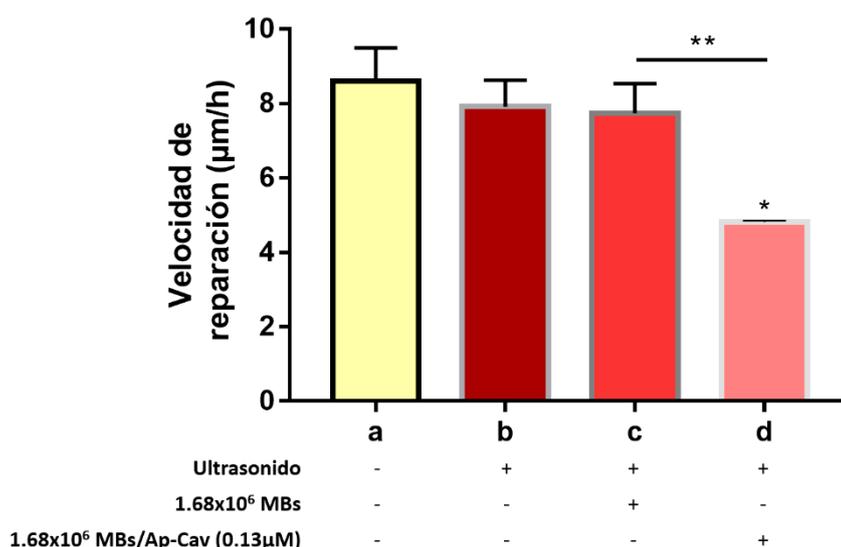


Figura 7-13. Efecto de los diferentes componentes del sistema microburbujas-ultrasonido sobre la velocidad reparación. Velocidad de reparación ante el tratamiento control, ultrasonido, ultrasonido-microburbujas control y  $1.68 \times 10^6$  MBs con AP-Cav ( $0.13 \mu\text{M}$ ). Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ ,  $*P < 0.01$  vs control,  $**P < 0.01$ .

El último tratamiento que se aplicó fue la adición de  $1.68 \times 10^6$  microburbujas unidas a AP-Cav junto con el ultrasonido. De acuerdo con la capacidad de carga de AP-Cav, y a los volúmenes manejados para el ensayo de reparación de la herida, esta cantidad de microburbujas representa una concentración final de AP-Cav de  $0.13 \mu\text{M}$ . Esta condición

mostró una velocidad promedio de  $4.81 \pm 0.02 \mu\text{m/h}$ , lo que indica una reducción estadísticamente significativa en comparación tanto con el control como con las microburbujas control y ultrasonido. Planteando este resultado como el porcentaje de inhibición de la reparación endotelial respecto al grupo control, se obtuvo una inhibición del 44%. Este resultado es de gran relevancia pues con el sistema implementado de liberación controlada de AP-Cav a partir de un sistema de microburbujas-ultrasonido se logró potenciar el efecto inhibitorio de la AP-Cav hasta 10 veces, ya que como se observa en la Figura 7-14, con una concentración de  $0.13 \mu\text{M}$  de AP-Cav liberada se logró un efecto inhibitorio mayor al observado con la AP-Cav libre ( $1 \mu\text{M}$ , 29.7%).

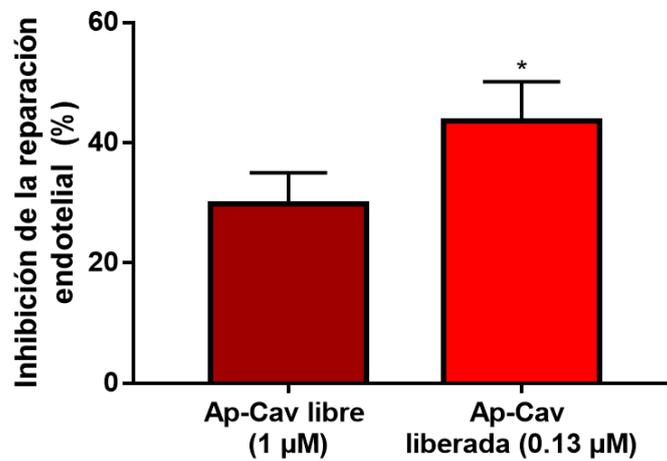


Figura 7-14. Porcentaje de inhibición de la reparación endotelial de la AP-Cav libre ( $1 \mu\text{M}$ ) y liberada a partir del sistema de microburbujas ultrasonido ( $0.13 \mu\text{M}$ ) Los datos representan el promedio  $\pm$  SEM,  $n=3$ ,  $*P < 0.01$ .

## 8 Discusión

En el presente estudio, se implementó el sistema de liberación controlada de AP-Cav a partir de un sistema de microburbujas-ultrasonido previamente desarrollado en el laboratorio [38], con la finalidad de evaluar su efecto sobre la función endotelial mediante un estudio *in vitro* con las células de microvasculatura de ratón bEnd.3. Para ello, se caracterizaron los componentes y parámetros del sistema para valorar su impacto por separado y en conjunto sobre la reparación endotelial, ya que, si este proceso se ve afectado, es un indicio de que el tratamiento desarrollado podría escalarse como un agente antiangiogénico en el futuro.

Los resultados obtenidos demostraron que con el empleo de una cantidad de  $1.68 \times 10^6$  microburbujas unidas a AP-Cav (a una concentración final de  $0.13 \mu\text{M}$ ) y el estímulo del ultrasonido bajo las condiciones de  $2 \text{ W/cm}^2$ , con una frecuencia de 1 MHz y a 10% de ciclo de trabajo, se logró potenciar el efecto inhibitorio de la AP-Cav hasta aproximadamente 10 veces sin comprometer a las células endoteliales proponiendo así, un sistema de liberación controlada de AP-Cav inhibidor de la formación de nuevos vasos.

La necesidad de desarrollar, caracterizar y aplicar este sistema de entrega radica en su potencial aplicación como un agente antitumoral, puesto que desde 1970 se propuso que el uso de agentes antiangiogénicos durante el desarrollo de cáncer, cortan o limitan el riego sanguíneo con la intención de disminuir la cantidad de nutrientes y oxígeno disponible para las células cancerígenas [39]. Desde entonces, múltiples fármacos antiangiogénicos se han desarrollado, entre los que se encuentran anticuerpos monoclonales anti-VEGF, receptores señuelos del VEGF y moléculas pequeñas inhibitoras de la tirosina quinasa (TKIs por sus siglas en inglés) [40]. Sin embargo, en adición a que estos tratamientos presentan un alto costo, son múltiples los efectos adversos de consideración y existe una alta resistencia tumoral a estos fármacos [41,51].

A pesar de que el empleo de la proteína Caveolina-1 o su dominio de anclaje conjugado a la antenapedia (AP-Cav o Cavtratina) es considerado como una alternativa a los agentes antiangiogénicos en existencia por su actividad antiangiogénica demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* [52, 23, 32], su aplicación a nivel clínico aún no es del todo aceptado pues se ha demostrado que presenta efectos adversos, ya que son muchas las rutas metabólicas con las que la AP-Cav puede interactuar en sitios no deseados [31, 43]. En vista de que

las concentraciones a las cuales se reportó el efecto de AP-Cav sobre la función endotelial, que van desde 10 hasta 50  $\mu\text{M}$  [52, 32, 44], la concentración de 0.13  $\mu\text{M}$  con la cual se observó un efecto en el presente estudio es un resultado alentador, pues indica que la liberación controlada de AP-Cav con el sistema de microburbujas-ultrasonido contribuiría a reducir drásticamente la dosis administrada del péptido, haciéndolo así un posible tratamiento más seguro con menores efectos adversos.

Si bien, con el sistema implementado se logró observar un efecto inhibitorio de la reparación endotelial *in vitro*, algunas características de las microburbujas, como la eficiencia de unión del 10.17%, deben de ser mejoradas para lograr administrar mayores cantidades de AP-Cav con menor cantidad de microburbujas. Lo anterior debido a que la concentración de microburbujas administrada puede ser un limitante donde aplicar el ultrasonido con una concentración superior al orden de  $10^7$  o  $10^8$  MBs/ml puede dañar severamente la viabilidad del endotelio vascular de acuerdo con estudios *ex vivo* e *in vivo* realizados [38, 45, 46], debido al proceso de cavitación explicado en la introducción.

Cabe recalcar, que los parámetros empleados bajo los cuales se observó un efecto inhibitorio de la reparación endotelial cumplen con los requerimientos establecidos en la literatura para su uso como agente terapéutico. Por un lado, las condiciones del ultrasonido de 2  $\text{W}/\text{cm}^2$  y ciclo de trabajo del 10% está por debajo del límite de 3  $\text{W}/\text{cm}^2$  en el cual se compromete al endotelio [32]. Respecto al tamaño de las microburbujas, las obtenidas con un diámetro promedio de 1.22  $\mu\text{m}$  se encuentran por debajo del límite máximo recomendado de 10  $\mu\text{m}$  [46], que es la dimensión aproximada de las células sanguíneas. De este modo, las microburbujas presentarían una reología similar a los glóbulos rojos dentro de la microvasculatura y capilares en la circulación.

Sin embargo, estos parámetros pueden variar bajo otras condiciones, como por ejemplo un estudio *ex vivo* o *in vivo*. Mientras que el estudio *in vitro* cumple con tener una monocapa de células endoteliales, en los vasos sanguíneos hay también otros tipos celulares, como células del músculo liso y pericitos en las paredes o las células sanguíneas en circulación, que pueden modificar el comportamiento de las microburbujas. Por tanto, podría requerirse una mayor concentración de microburbujas, una distribución de tamaño más angosta o mayor intensidad de ultrasonido [47].

Mientras que el ensayo de reparación de la herida es ampliamente aceptado para evaluar la función endotelial *in vitro* pues simula el proceso de la formación de nuevos vasos ante

el daño celular, otros estudios de este tipo podrían reforzar el impacto de la liberación controlada de AP-Cav sobre la función endotelial, previo a escalarlo a modelos animales, como lo son ensayos de proliferación celular [42], otros ensayos para migración celular como la cámara modificada de Boyden [48] y ensayos de diferenciación que estimulan la formación de estructuras tubulares [49], para reforzar el panorama del impacto del sistema sobre la función endotelial y en dado caso describir sobre que mecanismo celular se tiene mayor impacto.

Como el proyecto desarrollado tuvo un enfoque sobre la función endotelial, los mecanismos moleculares subyacentes que fueron alterados durante la reparación del daño celular pueden ser especulados a partir de la información presentada en la introducción y marco teórico. Puesto que un factor clave para el desarrollo de la angiogénesis es la síntesis del ON y la Caveolina-1 tiene una regulación negativa específica sobre la eNOS, es por lo tanto, muy probable que fuera esta vía la alterada por el sistema de liberación controlada de AP-Cav. Lo anterior está fundamentado a nivel celular porque el ON aumenta la permeabilidad celular, promueve la formación de estructuras tubulares y su síntesis es estimulada en presencia del VEGF [44].

Aunque el trabajo desarrollado por Navarro (2019) sentó las bases para el empleo de la liberación de AP-Cav a partir de un sistema de microburbujas-ultrasonido con la finalidad de observar efectos significativos sobre la función endotelial dependiente del ON administrando una dosis menor, demostrar que el empleo de dicho sistema potencia los efectos inhibitorios de la AP-Cav sobre funciones endoteliales relacionadas directamente con la angiogénesis, como la reparación del daño endotelial, es de gran relevancia, pues es evidencia directa de que la proliferación y migración de células endoteliales se están viendo afectadas. Por ende, el trabajo desarrollado en este proyecto abre puertas para su empleo en modelos *in vivo* con el objetivo final de tratar patologías donde el proceso de la formación de nuevos vasos se ve acelerado, como lo es el crecimiento tumoral.

## 9 Conclusiones

Los resultados establecidos en el presente estudio indican que es posible obtener datos relevantes y precisos sobre el comportamiento de las células endoteliales mediante el análisis minucioso de la velocidad de reparación con un modelo confiable *in vitro* del proceso de angiogénesis.

El ensayo de reparación de la herida permitió, tanto detectar sutiles diferencias en la respuesta de las células endoteliales ante el daño endotelial en la presencia de la molécula inhibidora de la función endotelial AP-Cav a manera de dosis-respuesta, como implementar y evaluar los efectos de la liberación controlada de AP-Cav a partir de un sistema de microburbujas-ultrasonido sobre la función endotelial.

Con el empleo del sistema de liberación controlada de AP-Cav a partir de microburbujas se logró potenciar su efecto inhibitorio de la función endotelial aproximadamente 10 veces, lo que sugeriría una reducción de los efectos adversos que imposibilitan actualmente su uso *in vivo*. Con eso, se abren las puertas para su aplicación como un agente antiangiogénico que pudiese funcionar como un supresor del crecimiento tumoral.

## 10 Perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos y lo planteado en la sección de Discusión, aún hay un considerable campo por estudiar en lo que concierne a la liberación controlada de AP-Cav a partir de un sistema de microburbujas-ultrasonido y su impacto en la función endotelial. De manera inmediata, se encuentra la necesidad de evaluar el impacto del sistema sobre la proliferación de células endoteliales, la permeabilidad y estudios específicos de migración celular con la finalidad de reforzar su potencial uso en la terapia antiangiogénica.

Se recomienda el estudio exhaustivo sobre los mecanismos moleculares alterados por la AP-Cav responsables del fenómeno observado sobre la función endotelial tales como la síntesis de ON, actividad y expresión de la eNOS, u otras vías de relevancia durante la angiogénesis en las células endoteliales.

Previo a escalar los estudios a nivel *in vivo*, sería de gran relevancia eficientizar el método de la síntesis de microburbujas y la unión a la AP-Cav con la finalidad de aumentar la capacidad de carga para lograr concentraciones adecuadas para su empleo en modelos animales. Además de buscar obtener una distribución de tamaño más estrecha pues esto mejoraría considerablemente la respuesta al ultrasonido y por ende su efecto.

A largo plazo, ya reforzados los puntos anteriores, el uso de modelos de angiogénesis *in vivo* como el de la remoción de la arteria femoral implementado previamente en el laboratorio, son estrictamente necesarios para evaluar el impacto y la eficiencia del sistema como agente antiangiogénico.

## 11 Bibliografía

1. Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: an Update. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4411,
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell* (2002). 4th edition. New York: Garland Science. Blood Vessels and Endothelial Cells.
3. Illustration from Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013.
4. van Hinsbergh V. W. (2012). Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Seminars in immunopathology*, 34(1), 93–106.
5. Pober, J., Sessa, W. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 7, 803–815
6. Lüscher TF, Tanner FC. (2007). Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertens*. 1993 Jul;6(7 Pt 2):283S-293S. d
7. Félétou M. (2011). The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. Chapter 2, Multiple Functions of the Endothelial Cells.
8. Michel, T., & Feron, O. (1997). Perspective Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases: Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why? *J. Clin. Invest.*, 100(9), 2146–2152.
9. Forstermann, U., Sessa, W. C. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837.
10. H. Durán, W. N., Beuve, A. V., & Sánchez, F. A. (2013). Nitric oxide, S-nitrosation, and endothelial permeability. *IUBMB life*, 65(10), 819–826.
11. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213–219.
12. Gallo, O., Masini, E., Morbidelli, L., Franchi, A., Fini-Storchi, I., Vergari, W. A., & Ziche, M. (1998). Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(8), 587–596
13. Tonini, T., Rossi, F. & Claudio, P. (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 22, 6549–6556.
14. Adair TH, Montani JP. (2010). Angiogenesis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. Chapter 1, Overview of Angiogenesis
15. Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. (1996). Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 270:H411–5
16. Martínez-Ruiz M, Vargas-Robles H, Rios A, Sánchez D, Escalante B. (2019). Comparative effects of nitric oxide dependent and independent vasodilation on

- impaired hindlimb revascularization in eNOS<sup>-/-</sup> mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 97(5):377-385
17. Bucci, M., Gratton, J.-P., Rudic, R. D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G., & Sessa, W. C. (2000). *In vivo* delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nature Medicine*, 6(12), 1362–1367.
  18. Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F (2011) (-)-Epicatechin induces calcium and translocation independent eNOS activation in arterial endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300(4): C880–887
  19. Derossi et al., *J. Biol. Chem.* 269:10444-10450 (1994).
  20. Bernatchez, P. N., Bauer, P. M., Yu, J., Prendergast, J. S., He, P., & Sessa, W. C. (2005). Dissecting the molecular control of endothelial NO synthase by caveolin-1 using cell-permeable peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), 761–766
  21. Hatakeyama, T., Pappas, P. J., Hobson, R. W., Boric, M. P., Sessa, W. C., Durán, W. N. (2006). Endothelial nitric oxide synthase regulates microvascular hyperpermeability in vivo. *The Journal of physiology*, 574(1), 275-281.
  22. Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357(3), 593–615.
  23. Morais, C., Ebrahim, Q., & L, N. (2012). Altered Angiogenesis in Caveolin-1 Gene – Deficient Mice Is Restored by Ablation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *AJPA*, 180(4), 1702–1714.
  24. Lin, M. I., Yu, J., Murata, T., Sessa, W. C. (2007). Caveolin-1–Deficient Mice Have Increased Tumor Microvascular Permeability, Angiogenesis, and Growth. *Cancer research*, 67(6), 2849-2856.
  25. Forstermann, U., Sessa, W. C. (2011). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837.
  26. Xu, S., Zhou, X., Yuan, D., Xu, Y., & He, P. (2013). Caveolin-1 scaffolding domain promotes leukocyte adhesion by reduced basal endothelial nitric oxide-mediated ICAM-1 phosphorylation in rat mesenteric venules. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305(10), H1484–H1493.
  27. Wang, Y., & Kohane, D. S. (2017). External triggering and triggered targeting strategies for drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 2(6), 17020
  28. Mulvana, H., Browning, R. J., Luan, Y., De Jong, N., Tang, M. X., Eckersley, R. J., & Stride, E. (2017). Characterization of contrast agent microbubbles for ultrasound imaging and therapy research. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 64(1), 232–251
  29. P.F. Morales Martínez (2019). Modificación de la permeabilidad de la capa endotelial mediado por un complejo proteína-microburbuja (Tesis de doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Monterrey)
  30. Figueiredo, M., & Esenaliev, R. (2012). PLGA Nanoparticles for Ultrasound-Mediated Gene Delivery to Solid Tumors *PLGA Nanoparticles for Ultrasound-*

31. Brouet, A., Dewever, J., Martinive, P., Havaux, X., Bouzin, C., Sonveaux, P., & Feron, O. (2005). Antitumor effects of in vivo caveolin gene delivery are associated with the inhibition of the proangiogenic and vasodilatory effects of nitric oxide. *The FASEB Journal*, 19(6), 1–15.
32. Xu, H., Zhang, L., Chen, W., Xu, J., Zhang, R., Liu, R., ... Tang, Z. (2017). Inhibitory effect of caveolin-1 in vascular endothelial cells, pericytes and smooth muscle cells. *Oncotarget*, 8(44), 76165–76173.
33. J.A. Navarro (2019). Liberación controlada del péptido Antennapedia/Caveolina-1 (AP-Cav) a partir de microburbujas y su efecto inhibitorio en la relajación vascular ex vivo dependiente de la síntesis de óxido nítrico (ON) (Tesis de doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Monterrey).
34. Chowdhury S.M., Lee T., Willmann J.K. (2017). Ultrasound-guided drug delivery in cancer. *Ultrasonography*. 36,171–184
35. Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). Cell Adhesion & Migration An introduction to the wound healing assay using live cell microscopy an introduction to the wound healing assay using live cell microscopy. *Cell Adhesion and Migration*, 8(5), 440–451.
36. Navarro-Becerra, J. & Franco-Urquijo, Carlos & Ríos, Amelia & Escalante, Bruno. (2021). Localized Delivery of Caveolin-1 Peptide Assisted by Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction Potentiates the Inhibition of Nitric Oxide-Dependent Vasodilation Response. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 47. 10.10
37. Hui, C. (2006). Carrying capacity, population equilibrium, and environment's maximal load. *Ecological Modelling*, 192(1-2), 317–320.
38. Navarro-Becerra JA, Caballero-Robledo GA, Franco-Urquijo CA, Ríos A, Escalante B. (2020). Functional Activity and Endothelial-Lining Integrity of Ex Vivo Arteries Exposed to Ultrasound-Mediated 551 Microbubble Destruction. *Ultrasound Med Biol*. 46:2335–2348.
39. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285:1182–6.
40. Al-Husein, B., Abdalla, M., Trepte, M., Deremer, D. L., & Somanath, P. R. (2012). Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Pharmacotherapy*, 32(12), 1095–1111.
41. Marx J. Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science*. 2003;301:1308–10
42. Auerbach R. & Auerbach W. (2001) Assays to study angiogenesis. In: Tumor Angiogenesis and Microcirculation. pp. 91–102. (eds. E.E. Voest & P.A. D'Amore). New York: Marcel Dekker.
43. Bernatchez, P. (2020). Endothelial caveolin and its scaffolding domain in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(2), 471–483.

44. Kwiatek, A. M., Minshall, R. D., Cool, D. R., Skidgel, R. A., Malik, A. B., & Tirupathi, C. (2006). Caveolin-1 regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> influx by binding of its scaffolding domain to transient receptor potential channel-1 in endothelial cells. *Molecular Pharmacology*, 70(4), 1174–1183.
45. Shigeta K, Itoh K, Ookawara S, Taniguchi N, Omoto K. (2004) Endothelial Cell Injury and Platelet Aggregation Induced by Contrast Ultrasonography in the Rat Hepatic Sinusoid. *J Ultrasound*. 23:29–36.
46. Chowdhury, S. M., Abou-Elkacem, L., Lee, T., Dahl, J., & Lutz, A. M. (2020). Ultrasound and microbubble mediated therapeutic delivery: Underlying mechanisms and future outlook. *Journal of Controlled Release*, 326, 75–90.
47. Stride, E., Segers, T., Lajoinie, G., Cherkaoui, S., Bettinger, T., Versluis, M., & Borden, M. (2020). Microbubble Agents: New Directions. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 00(00).
48. Alessandri G., Raju K., Gullino P.M. (1983) Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo. *Cancer Res*. 43, 1790–1797
49. Lawley T.J. & Kubota Y. (1989) Induction to morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *J. Invest. Dermatol.* 93, 59S–61S
50. Dewever J, Frerart F, Bouzin C, Baudelet C, Ansiaux R, Sonveaux P, Gallez B, Dessy C, Feron O. (2007) Caveolin-1 is critical for the maturation of tumor blood vessels through the regulation of both endothelial tube formation and mural cell recruitment. *Am J Pathol*. 171:1619-1628
51. Agaoglu S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. (2011) Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokine balance favoring Th2 vs Th1/Th17. *Blood*. 117(26):7021-31
52. Jiang, Y., Lin, X., Tang, Z., Lee, C., Tian, G., Du, Y., ... Li, X. (2017). Critical role of caveolin-1 in ocular neovascularization and multitargeted antiangiogenic effects of cavtratin via JNK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10737–10744