



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO
PROGRAMA DE GRADOS ACADÉMICOS

TESIS

“Efecto de aliskireno sobre la angiogénesis en modelo de membrana alantocoriónica (MAC) de pollo”

Raúl Manuel de la Fuente Espinoza

Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Médicas y Biológicas
Mención Morfología

Director de Tesis: Dr. David Lemus

2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

RAÚL MANUEL DE LA FUENTE ESPINOZA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Ciencias Médicas y Biológicas** con **mención en Morfología** en Examen de Defensa de Tesis el día 10 de Octubre de 2013.

Prof. Dr. David Lemus
Director de Tesis
Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. JUAN CARLOS PRIETO

PROF. DR. JORGE ZUÑIGA

PROF. DR. ARTURO FERREIRA

PROF. DRA. MARÍA SOLEDAD BERRIOS
Presidente Comisión de Examen

DEDICATORIA

A mi hermana, porque sigue entre nosotros.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento y gratitud a mi Director de Tesis, Dr. David Lemus, por todo su apoyo y ayuda durante la realización de este trabajo, por enriquecer su contenido y por acompañarme durante toda mi permanencia en el Programa de Magister. Sin duda, de no ser por él, este trabajo no habría llegado a su fin, o en su defecto, no habría terminado de la manera satisfactoria en que terminó.

Agradezco a la Sra. Irma Orellana por toda su ayuda durante la realización de este trabajo y por su excelente voluntad para ayudarme cuando fue necesario.

Muchas gracias a Carlos Rosas, por su ayuda y su voluntad cada vez que lo requerí, y por orientarme durante este largo proceso.

También agradezco al Profesor Héctor Rodríguez, por su ayuda generosa prestándome su laboratorio y sus implementos, y por sus críticas constructivas para hacer de éste un mejor trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
MARCO TEÓRICO.....	8
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	33

RESUMEN

MARCO TEORICO: La angiogénesis es la proliferación de vasos sanguíneos desde vasos preexistentes. Se ha documentado la acción antiangiogénica de los inhibidores del receptor de angiotensina II (ARA II), sin embargo, no se ha descrito la relación entre angiogénesis y los inhibidores directos de la renina (DRIs), que también participan regulando el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). **OBJETIVO:** Demostrar el efecto antiangiogénico de aliskireno, un DRI, en membranas alantocoriónicas de pollo. **MATERIAL Y METODO:** Aliskireno y enalapril sobre MAC fueron instilados en distintas concentraciones y comparados. En secciones histológicas seriadas se registró el número de vasos sanguíneos presentes en 9000 μm^2 bajo microscopio de luz a máximo aumento, y se realizó análisis estadístico utilizando Anova y el test de Tukey para demostrar posibles diferencias. **RESULTADOS:** Los receptores tratados con aliskireno, en ambas concentraciones utilizadas, presentaron menor densidad vascular, en comparación con los controles, siendo ésta estadísticamente significativa a mayor concentración. **CONCLUSIONES:** Aliskireno en concentraciones altas tiene un efecto antiangiogénico en un modelo experimental de MAC. Este hallazgo plantea la necesidad de estudios posteriores, dada la proyección que podría tener el uso inhibidores directos de la renina. A partir de estos resultados, se podría pensar en la factibilidad del uso de alskireno para la modulación de la angiogénesis en diversas enfermedades crónicas no transmisibles.

ABSTRACT

BACKGROUND: Angiogenesis is the formation of new blood vessels from pre-existing ones. Antiangiogenic effect of angiotensin receptor blockers has been reported, however, the relationship between direct renin inhibitors and angiogenesis has not been well described. **OBJECTIVE:** To prove the antiangiogenic effect of aliskiren, a direct renin inhibitor, on chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **MATERIALS AND METHODS:** Aliskiren and enalapril were instilled in different concentrations and compared. In serial histological sections, the number of blood vessels per 9000 μm^2 area under observation through optical microscope using maximum zoom was registered. Statistical analysis using Anova and Tuckey test in order to show possible differences, was performed. **RESULTS:** Receptors treated with aliskiren presented lower vascular density, which was statistically significant when a higher concentration was administered. **CONCLUSIONS:** High concentrations of aliskiren have an antiangiogenic effect on CAM assay. This finding means further studies are needed, because of the usefulness direct renin inhibitors could have. These results, also, might enhance the possibility of using aliskiren for regulating angiogenesis in the context of non transmissible chronic diseases.

MARCO TEÓRICO

Se define angiogénesis como la neoformación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Para que este fenómeno tenga lugar, se requiere la coexistencia de diversos procesos, tales como: proliferación y migración celular, reclutamiento celular y activación de diversas moléculas (moléculas de adhesión celular, interleuquinas y factores de crecimiento). Asimismo, precisa de la activación de múltiples vías de señales intracelulares. La angiogénesis incluye etapas tales como: vasodilatación, degradación de la membrana basal de la pared vascular y alteración del contacto intercelular (Blasi et al, 2002), migración, proliferación y maduración de células endoteliales (Jain, 2003) y reclutamiento de células periendotheliales (células musculares lisas y pericitos). Además. Se tiene una población celular proveniente de la médula ósea, las células progenitoras endoteliales (EPC), las que al llegar a un sitio donde hay angiogénesis, se unen a la pared de un vaso en crecimiento para diferenciarse a células endoteliales (Asahara et al, 1997).

MECANISMOS REGULADORES DE LA ANGIOGÉNESIS

A) Factor de crecimiento vascular endotelial tipo A (VEGF-A), sus receptores (VEGFR-1 y 2) y sus vías de transducción de señales

El factor de crecimiento del endotelio vascular tipo A (VEFG-A), juega un rol fundamental en la angiogénesis, siendo la molécula más conocida en relación a este proceso. Esta citoquina, expresada en tejidos donde se requiere actividad angiogénica, como por ejemplo la placenta y el cuerpo lúteo, (Papetti et al, 2002), se une a dos receptores con actividad tirosina kinasa: VEGFR-1 y VEGFR-2, siendo este último el más importante en la acción mitogénica, angiogénica y permeabilizadora del VEGF-A, aun cuando VEGF-A se une con una afinidad 50 veces mayor al primero. VEGFR-1 actúa como un “señuelo” que, al secuestrar al VEFG-A, impide su interacción con el VEGFR-2 (Ferrara et al, 2005). Se ha descrito además la existencia de un tercer receptor, denominado

VEGFR-3, pero no se relaciona con la acción de VEGF-A, observándose que otras formas de este factor de crecimiento (VEGF-C y VEGF-D) se unen a él. VEGFR-3 se expresa en el endotelio de vasos linfáticos, y su acción se relaciona con procesos de linfangiogenesis (Kaipainen et al, 1995). La acción de VEGF-A se lleva a cabo fundamentalmente sobre las células del endotelio vascular, aumentando su permeabilidad de diversas maneras: aumenta el transporte intracelular a través de organelos y vesículas (Senger et al, 1997), reorganiza las uniones cadherina/catenina deshaciendo las uniones estrechas intercelulares (Esser et al, 1998; Kevil et al, 1998) y estimula la producción de activadores del plasminógeno y sus inhibidores (Pepper, 1997), así como de colagenasa intersticial. Otras acciones realizadas por VEGF-A sobre las células endoteliales están dadas por la estimulación de la proliferación (Conolly et al, 1989; Fernández et al, 1999) y migración celular (Gospodarowicz et al, 1987), así como la inhibición de la apoptosis (Gerber et al, 1998).

B) Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Esta molécula presenta 2 formas: ácida (aFGF) y básica (bFGF), presentando ambas semejanzas funcionales con VEGF-A: tanto aFGF como bFGF estimulan la proliferación (Gospodarowicz et al, 1989) y migración (Terranova et al, 1985) celulares, así como la producción de activadores del plasminógeno e inhibidores (Millauer et al, 1993). Asimismo, no actúa sólo sobre las células endoteliales, ya que se ha observado que estimula la proliferación en fibroblastos, mioblastos, condrocitos y osteoblastos (Thomas, 1987). Sin embargo, se sabe que ratones deficientes en FGF presentan un desarrollo vascular normal (Folkman et al, 1983; Lobb et al, 1985). Actualmente, se plantea que FGF participa principalmente en procesos de angiogenesis local tras daño vascular (Miller et al, 2000).

C) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

Originalmente descrito en estas células, ha sido hallado también en fibroblastos, queratinocitos, mioblastos, astrocitos, células epiteliales y macrófagos. Presenta 2 isoformas, PDGF A y PDGF B, del mismo modo, su receptor puede encontrarse en 2 subtipos distintos: α y β (Heldin et al, 1999). Se ha descrito la capacidad de esta molécula de estimular la proliferación de pericitos in vitro, mientras que en estudios in vivo en ratones con deficiencia de PDGF estos sujetos presentan muerte perinatal debido a

hemorragia y edema, con ausencia de pericitos en los vasos sanguíneos (Lindahl et al, 1997). Este factor de crecimiento es el encargado de la proliferación y migración de estas células a través de los vasos de neoformación (Hellstrom et al, 1999).

D) Células derivadas de la médula ósea

Además de las EPC, susceptibles de ser utilizadas como biomarcadores en procesos antiangiogénicos (Shaked et al, 2005) existen células derivadas de la médula ósea que pueden aumentar la secreción local de VEGF: células mieloides (Grunewald et al, 2006), neutrófilos (Hao et al, 2007; Nozawa et al, 2006) y macrófagos (Lin et al, 2007).

E) Angiopoyetinas 1 y 2 (ang-1 y ang-2)

Ang-1 se une como agonista al receptor tirosina-kinasa Tie-2, expresado en células endoteliales e involucrado en procesos angiogénicos (Kerbel et al, 2002), favoreciendo la maduración y estabilización de los vasos sanguíneos recién formados (Imhof et al, 2006). Ang-2 actúa como antagonista de Tie-2 y desestabiliza los vasos sanguíneos. Se expresa en células endoteliales en sitios de angiogénesis activa, por lo que promovería la angiogénesis en conjunto con VEGF (Kerbel, 2008).

F) Vía de transducción de señales Notch-Delta like ligand 4 (Dll4)

En esta vía de transducción de señales, descubierta en la década pasada, los receptores de superficie celular Notch (1, 2, 3 y 4), expresados por diversos tipos celulares, interactúan con ligandos transmembrana (jagged 1, jagged 2, Dll1, Dll 3 y Dll4) de células adyacentes. Las células endoteliales expresan los receptores Notch 1 y 4, así como los ligandos jagged 1, Dll1 y Dll4. Dll4, expresado exclusivamente en células endoteliales, es inducido por VEGF y se expresa principalmente en células en estado angiogénico (Gale et al, 2004). Se sabe también que la unión Notch-Dll4 disminuye tanto la formación como la remodelación capilar, y favorece el reclutamiento de pericitos. Estas acciones prevendrían una angiogénesis excesiva y favorecerían el desarrollo ordenado de nuevos vasos sanguíneos (Kerbel, 2008).

MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE LA ANGIOGÉNESIS

A) Antiangiogénicos endógenos

Tumstatina, un péptido de 232 aminoácidos presente en la cadena 3 del colágeno tipo IV. En roedores en los que se ha eliminado genéticamente la cadena 3, se ha observado incremento marcado de la densidad microvascular y de la velocidad de crecimiento tumoral. No se ha descrito a la fecha acción de esta molécula sobre otros factores angiogénicos, como VEGF, Bfgf o HIF (Maeshima et al, 2000).

Endostatina es un fragmento interno del colágeno tipo XVIII de 20 Kd, cuya hiperexpresión en roedores reduce la velocidad de crecimiento tumoral en un 300%, al comparar ratones que sólo presentan 1,6 veces más endostatina que aquéllos normales (Sund et al, 2005). Esto se asemeja a lo observado en humanos con Síndrome de Down, que al presentar 1,6 a 2 veces más endostatina que los sujetos sin enfermedad, son los más protegidos contra patologías angiogénesis-dependientes como: cáncer, retinopatía diabética y aterosclerosis (Chadefaux et al, 1998). Su capacidad de inhibir la migración de células endoteliales in vitro e in vivo, sigue un patrón bifásico, es decir, una curva dosis-eficacia en forma de “u” (Celik et al, 2001), con una mayor eficacia frente a dosis intermedias. Esto explica los fracasos al iniciarse su uso, ya los que las concentraciones utilizadas resultaron ser excesivas (Kuo et al, 2001).

B) Antiangiogénicos exógenos

Bevacizumab, anticuerpo monoclonal anti VEGF-A, el primer antiangiogénico aprobado por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos (FDA) para ser usado en quimioterapia contra cáncer de colon, y el primero en demostrar sobrevida en pacientes con cáncer avanzado (Ferrara et al, 2004). Actualmente, se estudia su utilidad al combinarse con otros agentes frente a otras neoplasias (Miller, 2005). Sus efectos colaterales, aunque infrecuentes (2% de los casos), deben ser considerados e incluyen: perforación gastrointestinal, retardo en el cierre de heridas, fenómenos tromboembólicos y hemoptisis (Browder et al, 2000).

Tarceva, también aprobado por la FDA, es un inhibidor del receptor tirosina kinasa para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) e inhibe la producción de moléculas angiogénicas. Se usa para el tratamiento del cáncer pulmonar. Actualmente, se ha demostrado que su uso conjunto con Caplostatina genera una sinergia importante, obteniéndose una actividad antitumoral mucho mayor a la de ambos fármacos por separado.

Caplostatina, el antiangiogénico de mayor espectro conocido a la fecha, corresponde a un análogo sintético de la fumagilina (Ferrara et al, 2004). Más de 100 laboratorios diferentes demostraron que la administración de 30 mg/kg/día de TNP-470 por vía subcutánea produce remisión tumoral entre un 40 y un 100% en ratas, hamsters y conejos (Satchi-Fainaro et al, 2004). Si bien se encontró asociación entre TNP-470 y neurotoxicidad, caplostatina presenta un espectro antitumoral similar a éste, pero puede ser usado en dosis hasta 10 veces mayores, sin que se documente toxicidad. Además, es el más potente inhibidor de la permeabilidad vascular, inhibiendo la acción de VEGF-A, factor activador de plaquetas y otras moléculas angiogénicas. Esta inhibición, específica para las células endoteliales, se lleva a cabo por mecanismos desconocidos (Satchi-Fainaro et al, 2005).

Las estatinas son fármacos que actúan inhibiendo la enzima HMG CoA reductasa, ampliamente utilizados en pacientes con factores de riesgo cardiovascular, reduciendo los niveles plasmáticos de colesterol (Skaletz-Rorowski et al, 2004). Se ha demostrado que favorecen la angiogénesis en condiciones de isquemia, incluso en individuos con niveles normales de colesterol. Los mecanismos subyacentes no se conocen aún, pero se sugiere una relación entre las estatinas y la activación de la proteína serina/treonina kinasa Akt, que regula la formación de óxido nítrico (NO) a partir de las células endoteliales (Skaletz-Rorowski et al, 2003), siendo esta propiedad independiente de su rol hipolipemiante, según lo demostrado en ratas (Boodhwani et al, 2006; Boodhwani et al, 2006). Sin embargo, se ha reportado también que su uso en dosis altas inhibe tanto la migración de células endoteliales como la angiogénesis (Weis et al, 2002, Ma et al, 2005). Se ha documentado su rol en el tratamiento de diversas neoplasias, como el cáncer colorrectal y prostático, así como en el melanoma (Demierre et al, 2005). Se plantea que aumentan el potencial proapoptótico tanto de las células tumorales como de varios factores citotóxicos, además de

disminuir la actividad antiapoptótica del VEGF y disminuir la secreción de metaloproteasas (Kaushal et al, 2003). Si bien los resultados de los ensayos clínicos en fase I/II y II no demuestran una mejoría estadísticamente significativa tras su uso, sí es posible que mejoren la efectividad de fármacos usados previamente en esquemas de quimioterapia (Jakobisiak et al, 2003).

ANGIOGÉNESIS EN PATOLOGÍA CRÓNICA

La patología tumoral es la entidad cuya asociación con procesos angiogénicos se encuentra más ampliamente documentada. Como se mencionó, VEGF-A es la molécula más conocida en relación a este proceso. Hoy en día, se sabe también que VEGFR-1 puede ser expresado por células tumorales, estando involucrado tanto en la liberación de factores de crecimiento (Hiratsuka, 2002) como en la mediación de señales quimiotácticas (Wey, 2005). La expresión génica del VEGF-A está regulada por el balance entre la hipoxia, que la favorece mediante la activación del factor inducible por hipoxia (HIF, Hypoxia-inducible factor), y la actividad de genes supresores, como el de von Hippel-Lindau (VHL) (Safran et al, 2003). A la fecha se conoce también la influencia de oncogenes, como erb-2/her2 o ras, que al sufrir mutaciones favorecen la producción de VEGF-A (Rak, 1995), y con ello, procesos de angiogénesis en células tumorales. Esto último es relevante en el pronóstico del tumor, ya que se ha descrito que la sola proliferación celular, en ausencia de angiogénesis, da origen a tumores microscópicos, inocuos para el huésped (Gerber, 2002).

Se conoce también la relación entre angiogénesis y microangiopatía diabética, en particular, retinopatía diabética. En relación a esta última, se sabe los productos finales de glicosilación o glicación avanzada, (AGEs, Advanced Glycation End products) moléculas que aparecen en condiciones tales como diabetes e insuficiencia renal, así como con la edad (Kota et al, 2006), favorecen la actividad de moléculas inflamatorias y la migración de monocitos a la pared vascular (Vlassara et al, 1995). La activación de su receptor (RAGE, Receptor for Advanced Glycation End products) desencadena una mayor liberación de VEGF, y con ello, neoformación de capilares, como se desprende de estudios

tanto en ratas (Sato et al, 2009) como en pacientes con insuficiencia renal que utilizan peritoneodiálisis (Boulanger et al, 2007). Se ha descrito, mediante estudios en membranas alantocoriónicas (MAC) de pollo, que los AGEs producen aumento de la angiogénesis in vivo, de un modo tanto dosis como tiempo-dependiente (Okamoto et al, 2002). Se ha establecido la asociación entre la unión de los AGEs a su receptor y neoplasias como carcinoma nasofaríngeo (Logson et al, 2007; Tsuji et al, 2008) y carcinoma oral de células escamosas (Sasahira et al, 2007).

Entre otras patologías crónicas no transmisibles asociadas a angiogénesis, se cuentan degeneración macular, artritis y psoriasis (Folkman, 2006).

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA Y ANGIOGÉNESIS

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) corresponde a una cascada enzimática compleja, que se activa sea frente a una disminución de la presión arterial o de los niveles de sodio en los túbulos renales. Se inicia con la formación de renina por las células del aparato yuxtaglomerular del riñón, la que al ser liberada al torrente sanguíneo, cataliza la transformación del angiotensinógeno, producido en el hígado, en angiotensina I, la que a su vez es transformada en angiotensina II, por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), a nivel pulmonar. La angiotensina II se une a dos receptores principales, denominados receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2). La unión de angiotensina II a AT1 estimula la producción en la corteza suprarrenal de aldosterona, mineralocorticoide que produce reabsorción de agua y sodio en los túbulos renales, aumentando de este modo tanto el volumen intravascular como el volumen minuto, produciéndose un efecto genómico resultante en vasoconstricción importante e inhibición de la excreción renal de agua y sodio, y un efecto no genómico que determina fibrosis, inflamación y remodelación cardíaca y vascular, por lo que la estimulación mantenida del receptor AT1 se asocia a hipertensión arterial, insuficiencia renal y accidentes cerebrovasculares. El receptor AT2 tendría una acción opuesta a AT1, regulando negativamente la síntesis de colágeno y el crecimiento celular a través de fenómenos de

vasodilatación y apoptosis, así como de inhibición tanto del estrés oxidativo como de la inflamación (Ager et al, 2008). La acción angiogénica de angiotensina II, se lleva a cabo de dos mecanismos diferentes, ocurriendo en ambos una transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF, Epidermal Growth Factor): uno de ellos involucra una fosforilación del receptor VEGFR-1, el otro está dado por la activación de la proteína tirosina-kinasa de bazo (Syk), proceso independiente de la expresión de VEGF. (Buharalioglu et al, 2011).

La relación entre la activación de AT1 y angiogénesis está bien documentada a partir del estudio del rol del SRAA en la génesis tumoral. La unión de angiotensina II a AT1 favorece la secreción por parte de las células tumorales de factores de crecimiento y citoquinas tales como VEGF, IL-8, PGF y FGF-2, potenciando por una parte el crecimiento de células de sostén como fibroblastos y células endoteliales, y por otra, la secreción por parte de los fibroblastos de IL-6, TGF β , EGF, IGF-1 y metaloproteinasas, que favorecen el crecimiento de las células tumorales. Células del sistema inmune innato (neutrófilos y macrófagos) generan y expresan angiotensina I, que por acción de la ACE presente en el estroma se convierte en angiotensina II, que ocupa la cascada de señales del SRAA para favorecer la formación de más factores de crecimiento y citoquinas, como VEGF, PDGF, IGF-1, FGF-2, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α . Asimismo, en condiciones de inflamación e hipoxia, los neutrófilos y macrófagos producen especies reactivas de oxígeno, que favorecerían la proliferación celular, la angiogénesis, el reclutamiento de células inflamatorias y posiblemente generan daño en el DNA. Estos procesos estarían dados por la activación de vías de señales intracelulares como la fosforilación de las proteínas MAPK (mitogen-activated protein kinase) o PI3K (phosphatoinositide 3-kinase), así como a la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B), responsable de la generación de proteínas antiapoptóticas, tales como survivina, BCL-XL y BCL-2, siendo este un mecanismo protector para las células tumorales (George et al, 2010).

En la actualidad, se sabe que el SRAA es en realidad un sistema biaxial. En 1988, Santos et al describieron la existencia del heptapéptido angiotensina (1-7) (Santos et al, 1988), describiéndose su actividad tanto *in vitro* como *in vivo* (Schiavone et al, 1989; Campagnole-Santos et al, 1989). La identificación del homólogo de enzima convertidora de

angiotensina denominado ACE2 como fundamental para la formación del heptapéptido, permitió documentar una nueva vía metabólica. La formación de angiotensina (1-7) puede darse a través de dos mecanismos: uno de ellos, más eficiente, implica la formación de angiotensina (1-7) por ACE2 directamente a partir de angiotensina II, (Vickers et al, 2002). El otro, menos relevante, está dado por la hidrólisis de angiotensina I por ACE2 para formar el péptido angiotensina (1-9), el cual, por acción de ACE, es convertido en angiotensina (1-7) (Donoghue et al, 2000; Rice et al, 2004). Se ha descrito, asimismo, la unión de angiotensina (1-7) al receptor asociado a proteína G Mas (Santos et al, 2003), lo que demuestra que su acción es independiente de la unión a los receptores AT1 o AT2. De este modo, se tienen los dos ejes antes descritos en el SRAA: por una parte, el tradicionalmente conocido ACE/angiotensina II/AT1, y por otra, ACE2/angiotensina (1-7)/Mas.

El eje ACE2/angiotensina (1-7)/Mas contrarresta los efectos deletéreos producidos por la acción del eje ACE/angiotensina II/AT1, favoreciendo la vasodilatación e inhibiendo fenómenos tales como disfunción endotelial, hipertrofia, proliferación celular, fibrosis, aterosclerosis, muerte celular y arritmias (Ferreira, 2005). Las acciones más ampliamente descritas se observan a nivel cardíaco y renal: En ratas, se ha observado que angiotensina (1-7) aumenta el volumen expulsivo, previene la remodelación cardíaca y, en dosis bajas, produciría vasodilatación del lecho coronario (Santos et al, 2013). Por otra parte, si bien existen abundantes estudios en relación a la acción de angiotensina (1-7) sobre el riñón, su rol a la fecha es aún controversial: en riñones de cerdo, angiotensina (1-7) tiene un efecto natriurético y diurético (Burgelova et al, 2002), estando ambos efectos inhibidos en modelos de ratas sometidas a sobrecarga de agua (Pinheiro, 2012), y se postula la acción de Mas en ambos procesos. Se sabe que en pacientes humanos hipertensos no tratados los niveles urinarios de angiotensina (1-7) se encuentran disminuidos en relación a voluntarios sanos (Ferrario et al, 1998). La actividad conocida hoy en día para el eje ACE2/angiotensina (1-7)/Mas excede ampliamente al corazón y al riñón, abarcando diversos territorios. Se postula que la interacción angiotensina (1-7)/Mas regula diferentes cascadas de señales intracelulares, tales como la vía PI3K/AKT y la vía de fosforilación de la proteína ERK (extracelular-signal-regulated kinase), actuando finalmente sobre efectores tales como NO, el factor de transcripción FOXO1 o ciclo-oxigenasa 2 (COX-2). (Passos-

Silva et al, 2013). A través de estas interacciones, el sistema ACE2/angiotensina (1-7)/Mas mejora condiciones patológicas tales como fibrosis e inflamación en pulmones, hígado y riñones (Lubel et al, 2009; Shenoy et al, 2010). También interviene positivamente en el metabolismo, aumentando la captación de glucosa y la lipólisis, e inhibiendo la resistencia a insulina y la dislipidemia (Giani et al, 2009; Santos et al, 2010). A nivel de sistema nervioso central, favorece el aprendizaje y la memoria en el hipocampo y la amígdala (Albrecht, 2007); a la vez que tiene un efecto protector contra el daño cerebral por isquemia, aumentando la expresión de óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y en consecuencia, la liberación de NO en ratas (Zhang et al, 2008). También actúa sobre el sistema reproductivo, estimulando sobre la ovulación, la espermatogénesis y la síntesis de esteroides sexuales (Santos et al, 2013).

El eje ACE2/angiotensina (1-7)/Mas tiene un efecto tanto antiangiogénico como antiproliferativo, este último estaría determinado tanto por una inhibición en la fosforilación de ERK como por una inhibición de COX-2, ambas moléculas involucradas en procesos de proliferación celular (Passos Silva et al, 2013). Asimismo, se ha observado que angiotensina (1-7) activa al factor de transcripción FOXO 1, el cual no solo activa genes relacionados con apoptosis y detención del ciclo celular, sino además regula negativamente la actividad angiogénica de las células endoteliales, por lo que de este modo actuaría inhibiendo el desarrollo de tumores (Calnan et al, 2008; Oellerich et al, 2012). A partir de estudios en ratas, se observó que la acción antiangiogénica de angiotensina (1-7) disminuía al agregarse el antagonista específico A-779, lo que no sucedió al administrarse losartán, antagonista de AT1, ni PD 123339, antagonista de AT2, ya sea aisladamente o combinados, e independientemente de la vía de administración (sistémica o local). Por lo tanto, es posible afirmar que la acción antiangiogénica de angiotensina (1-7) no se relaciona con la actividad del eje ACE/angiotensina II/AT1 (Machado et al, 2000).

El bloqueo del SRAA ha sido ampliamente usado en el tratamiento de la hipertensión arterial, utilizándose históricamente dos tipos de fármacos: los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACEI, o IECA en español), aparecidos a inicios de los '80, que actúan bloqueando la conversión de angiotensina I en angiotensina II; y los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA II), surgidos en la década

siguiente, que inhiben la unión de la angiotensina II a sus receptores tipo 1. En pacientes con hipertensión esencial se ha observado que telmisartán, un ARA II, disminuye los niveles plasmáticos de la forma soluble del receptor para AGEs (sRAGE) en relación a pacientes no tratados con este fármaco, demostrándose, además, que existe liberación de sRAGE a partir de la superficie de células expuestas a angiotensina II (Nakamura et al, 2005). Asimismo, olmesartan, otro ARA II, ha demostrado inhibir in vitro la angiogénesis inducida por la activación de RAGE (Yamagishi et al, 2007).

En 2007 salieron al mercado los inhibidores directos de renina (DRI, Direct Renin Inhibitors) (Brown, 2008), los que producen un bloqueo completo del SRAA, evitando efectos colaterales como el aumento compensatorio en los niveles de angiotensina II, que se asocia a mayor daño en órgano blanco y eventos cardiovasculares, o el aumento en la actividad de la renina plasmática, también relacionada con enfermedad cardiovascular en pacientes hipertensos tratados y no tratados (Buczko et al, 2008). El DRI más importante es el aliskireno, fármaco autorizado por la FDA para el tratamiento de la hipertensión en 2007 (Shafiq et al, 2008). Esta molécula, que se une con alta afinidad al sitio activo de la renina, tiene un elevado peso molecular y una baja biodisponibilidad. Sin embargo, la fracción absorbida es apenas metabolizada y lentamente excretado, por lo tanto, su concentración en plasma, tras dosis repetidas en rangos terapéuticos, puede exceder su IC50 entre 15 y 50 veces (Waldmeier et al, 2007). Experimentos en ratas insuliorresistentes e insulinosensibles sometidas a bombeo subcutáneo de aliskireno en dosis de 50 mg/kg/día permitieron constatar cambios metabólicos atribuibles a la inhibición de la renina (Habibi et al, 2008). Estudios clínicos muestran su eficacia disminuyendo la producción de péptidos natriuréticos, asociados a hipertensión, ya sea como alternativa a los IECA o asociado a ARA II o β -bloqueadores, en pacientes con insuficiencia cardíaca (Mc Murray et al, 2008). Asimismo, se ha documentado también su utilidad y seguridad en pacientes con antecedentes de hipertensión asociada a falla renal (Ito et al, 2010).

La inexistencia de literatura que describa la acción directa de aliskireno sobre la angiogénesis al aplicarse directamente sobre los vasos sanguíneos motiva la elección de este fármaco para su estudio, así como la interrogante que surge al no saber qué sucede con la angiogénesis al inhibirse el SRAA desde su inicio. Por su parte, el modelo de MAC de

pollo es de manejo relativamente sencillo y permite un acceso expedito a los vasos sanguíneos. La MAC se organiza en el embrión a las 72 horas de incubación, observándose a partir de entonces una abundante irrigación, que permite determinar el efecto del fármaco en estudio sobre los vasos de neoformación. Otras ventajas de este modelo radican en que es económico, no requiere grandes períodos de tiempo y constituye un método no invasivo de observación, a diferencia de otros modelos estudio de angiogénesis *in vivo*, tales como el microbolsillo corneal, la ventana mesentérica o el implante de esponja subcutánea, entre otros (Norrby, 2006).

HIPÓTESIS

Aliskireno afecta negativamente la neoformación de vasos sanguíneos en un modelo experimental de membrana alantocoriónica de pollo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la proliferación y diferenciación de vasos de neoformación en membrana alantocoriónica (MAC) de pollo en presencia de aliskireno, fármaco que actúa inhibiendo directamente la renina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Observar y cuantificar el efecto de aliskireno, administrado en distintas concentraciones, sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos en membrana alantocoriónica de pollo.

a) Determinar el efecto angiogénico de aliskireno en baja concentración sobre un modelo de MAC.

b) Determinar el efecto angiogénico de aliskireno en alta concentración sobre un modelo de MAC.

2.- Observar y cuantificar el efecto de enalapril, administrado en distintas concentraciones, sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos en membrana alantocoriónica de pollo.

a) Determinar el efecto angiogénico de enalapril en baja concentración sobre un modelo de MAC.

b) Determinar el efecto angiogénico de enalapril en alta concentración sobre un modelo de MAC.

3.- Determinar diferencias en la neoformación de vasos al comparar el efecto de la administración de ambos fármacos, sobre modelos experimentales de membrana alantocoriónica de pollo que se encuentren en una misma etapa del desarrollo embrionario.

MATERIALES Y METÓDOS

Medio de Cultivo

Huevos fertilizados White Leghorn.

Soluciones

-) Grupo Control: agua bidestilada
-) Grupo 1 : agua bidestilada + enalapril 2,03 μ M.
-) Grupo 2 : agua bidestilada + enalapril 8,12 μ M.
-) Grupo 3 : agua bidestilada + aliskireno 54,37 μ M.
-) Grupo 4 : agua bidestilada + aliskireno 108,74 μ M.

Incubación de los Huevos Receptores

Al iniciar el experimento, los huevos receptores fueron lavados con un algodón embebido en agua destilada, desinfectados con alcohol yodado y ubicados en bandejas en posición

horizontal para que el blastodisco se ubique en posición dorsal. A continuación los receptores fueron marcados en su cara superior y llevados a una cámara de incubación esterilizada a una temperatura de 37,8°C en una atmósfera humidificada. Cuarenta y ocho horas más tarde (al tercer día), se les abrió una ventana cuadrada en el polo apical de su cáscara y se les extrajo 2 ml de albúmina, de modo que la MAC en desarrollo se separara de la cáscara, luego se cerró esta ventana con papel celofán y se abrió una segunda ventana de 2,5 x 2 cm en la marca previamente señalada, exponiéndose los vasos sanguíneos subyacentes. Las burbujas generadas a partir de la succión de albúmina fueron eliminadas con un estilete al rojo vivo debido a que su presencia aumentaba el riesgo de contaminación (Molina et al, 2005; Toledo et al, 2010). Finalmente, se selló la ventana con cinta adhesiva transparente y los receptores fueron devueltos a la incubadora, donde permanecieron una semana. A partir de este momento, los receptores fueron permanentemente monitoreados, con el fin de retirar aquéllos que no sobrevivieron o que no se desarrollaron.

Los vasos sanguíneos de la MAC proliferan y se diferencian en arterias y venas hasta el día 8. De esta manera, se origina una red de capilares que ocupa un área determinada bajo el corion, determinando el intercambio gaseoso con el ambiente exterior. Una rápida proliferación celular continúa hasta el día 11, posteriormente se observa una marcada reducción en el índice mitótico, hasta que el sistema vascular alcanza su conformación definitiva el día 18, justo antes de la ruptura del cascarón.

Al décimo día, en cada uno de los grupos de trabajo establecidos previamente, se retiró la cinta adhesiva que cubría la ventana de 2,5 x 2 cm, para posibilitar la instalación de un disco milipore (metilcelulosa) de 5 mm de diámetro, previamente esterilizado, en forma directa sobre la superficie de la MAC en crecimiento. Con el fin de determinar el efecto de las distintas soluciones, los discos implantados fueron inoculados con 10 µl cada uno. Posteriormente los receptores fueron nuevamente sellados con cinta adhesiva transparente. Este procedimiento se llevó a cabo en el interior de la cámara de cultivo, con el objeto de disminuir las variaciones del medio.

Al décimo tercer día, se removieron los discos implantados en los receptores y las MACs adyacentes, siendo puestos en formalina al 10% durante 24 horas. Transcurrido este tiempo,

las muestras fueron retiradas de la solución fijadora y lavadas con agua (Zúñiga et al, 2003; Michel et al, 2011).

Deshidratación, Aclaración e Inclusión de las Muestras

Tras el lavado, las muestras fueron deshidratadas mediante el paso de una batería de alcoholes de graduación ascendente (80°-96°-100° durante 15 minutos), puestas en xilol durante 10 minutos en 3 ocasiones e impregnadas en parafina sólida con punto de fusión 56°C a una temperatura de 60°C.

Corte y Montaje

Se realizaron cortes de 5 micrones, los que fueron estirados en un baño térmico a 45°C, para luego ser depositados en portaobjetos impregnados previamente con albúmina, dejándose secar a 37°C durante 12 horas.

Desparafinación

Las muestras fueron bañadas tres veces con xilol durante 15 minutos en cada ocasión. Luego se les pasó por una batería de alcoholes de graduación descendente (tres lavados con alcohol 100°C, uno con alcohol 96°C y otro con alcohol 80°C, durante 7 minutos cada uno), se lavaron con agua corriente durante 5 minutos y se enjuagaron en agua destilada.

Análisis de Densidad Microvascular

Se determinó la densidad microvascular, entendiéndose ésta como el número total de vasos sanguíneos observados en un área de 9000 μm^2 (30 μm x 300 μm), desde un ocular ubicado a una distancia de 600 μm del filtro, en MAC de embriones de pollo normales de trece días de vida. Con este propósito, se utilizó un microscopio óptico con aumento máximo. Se efectuaron conteos en cada uno de los grupos de trabajo, obteniéndose valores muestrales del número de capilares sanguíneos.

Análisis Estadístico

Se utilizó el programa Graph Pad Prism® 5 y el análisis estadístico se realizó a través de ANOVA de una vía con Test de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un P-value < 0,05.

RESULTADOS

El número total de receptores puestos a incubar fue de noventa. Al tercer día, durante la extracción de albúmina, se constató que nueve de ellos no estaban fertilizados, siendo retirados de la incubadora. En los días siguientes, los receptores fueron monitoreados periódicamente para detectar y detectar a los que no sobrevivieran. Al tercer día se retiraron dos receptores, al cuarto día se retiraron tres, al séptimo día se retiraron dos y al noveno día se retiraron dos.

Se efectuó instilación de sustancias en un total de setenta y dos receptores, siendo estos repartidos de manera aleatoria en cinco grupos:

-) Grupo Control: agua bidestilada (12 receptores).
-) Grupo 1 : agua bidestilada + enalapril 2,03 μ M (14 receptores).
-) Grupo 2 : agua bidestilada + enalapril 8,12 μ M (14 receptores).
-) Grupo 3 : agua bidestilada + aliskireno 54, 37 μ M (16 receptores).
-) Grupo 4 : agua bidestilada + aliskireno 108,74 μ M (16 receptores).

Al décimo primer día, se retiraron cuatro receptores: dos del grupo 1 (enalapril 2,03 μ M) y dos del grupo 2 (enalapril 8,12 μ M). Al décimo tercer día, se retiraron dos receptores del grupo 4 (aliskireno 108,74 μ M).

El número de receptores fijados fue de sesenta y seis, distribuidos de la siguiente forma:

-) Grupo Control: 12 receptores
-) Grupo 1 : 12 receptores.
-) Grupo 2 : 12 receptores.
-) Grupo 3 : 16 receptores.
-) Grupo 4 : 14 receptores.

Comparación de la Acción de Fármacos Instilados Sobre la Angiogénesis

Aliskireno vs controles: La administración de aliskireno en las concentraciones utilizadas, produjo inhibición de la angiogénesis en modelos de MAC, siendo este efecto estadísticamente significativo respecto a los controles solo en aquellos sujetos instilados con alta concentración de este fármaco ($P < 0,05$) (Fig.1).

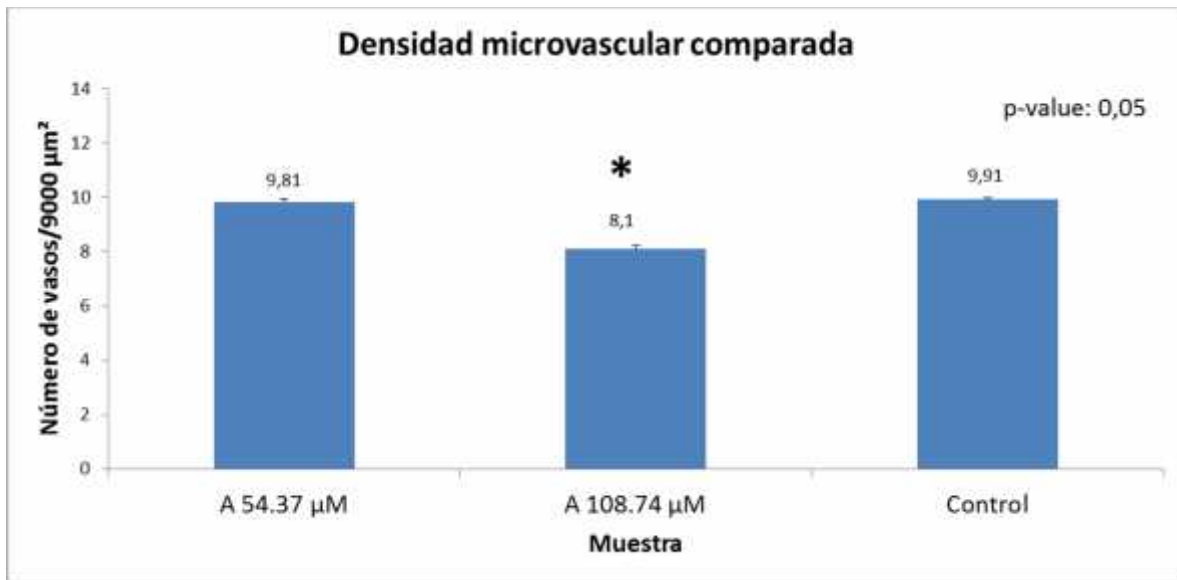


Figura 1: Aliskireno disminuye la densidad microvascular tanto a bajas como a altas concentraciones, al compararse con los controles. Sin embargo, la diferencia es estadísticamente significativa solo al administrarse la concentración máxima estudiada.

Como consecuencia de lo anterior, se observó también, en receptores de aliskireno en altas concentraciones, una menor migración de vasos sanguíneos hacia el corion, en relación a los controles (Fig.2)

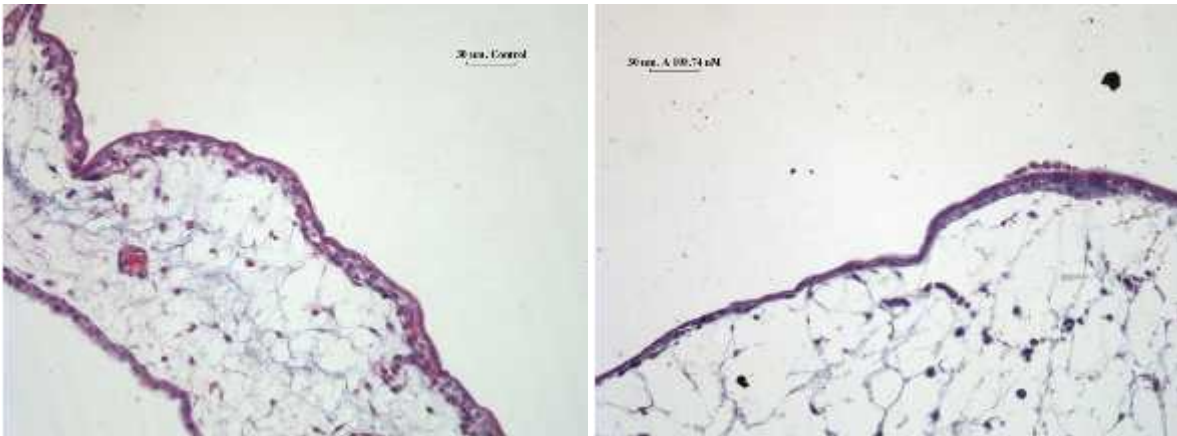


Figura 2: La instilación de aliskireno en la concentración máxima utilizada determina una caída en la migración vascular hacia el corion, y con ello, un menor intercambio gaseoso.

Enalapril vs controles: La administración de enalapril en las concentraciones estudiadas, produjo un efecto proangiogénico en modelos de MAC de pollo, encontrándose diferencia estadísticamente significativa en relación a los controles solo en aquellos sujetos que recibieron este fármaco en la concentración máxima utilizada ($P < 0,05$) (Fig. 3).

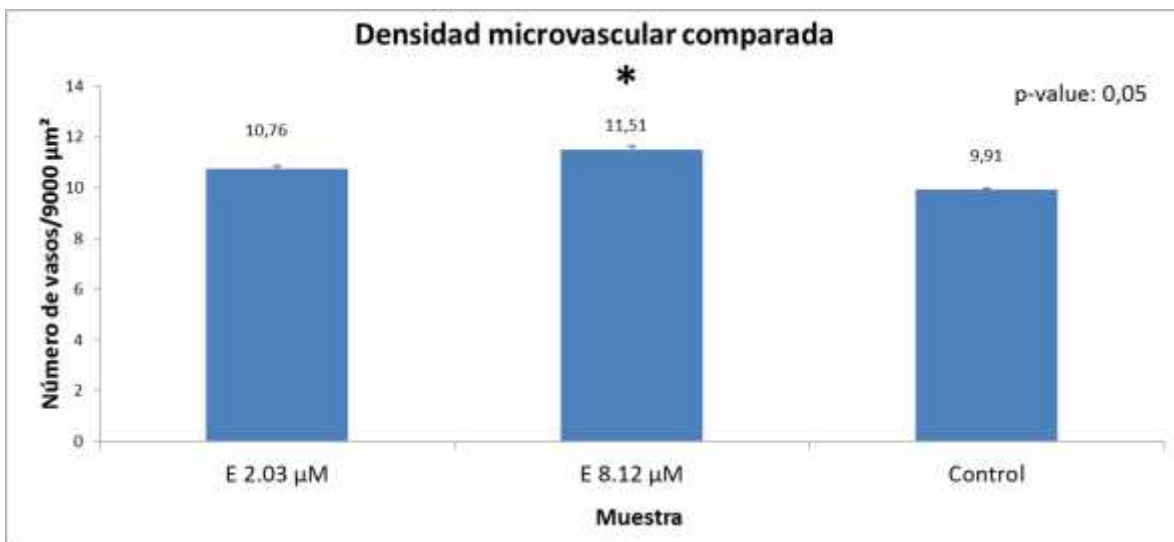


Figura 3: Enalapril aumenta la densidad microvascular tanto a bajas como a altas concentraciones, al compararse con los controles. Sin embargo, la diferencia es estadísticamente significativa solo al administrarse la mayor concentración estudiada.

En los individuos que recibieron enalapril en alta concentración, al constatarse una mayor angiogénesis, se vio también una mayor migración de vasos sanguíneos hacia el corion, al ser comparados con los controles (Fig. 4).

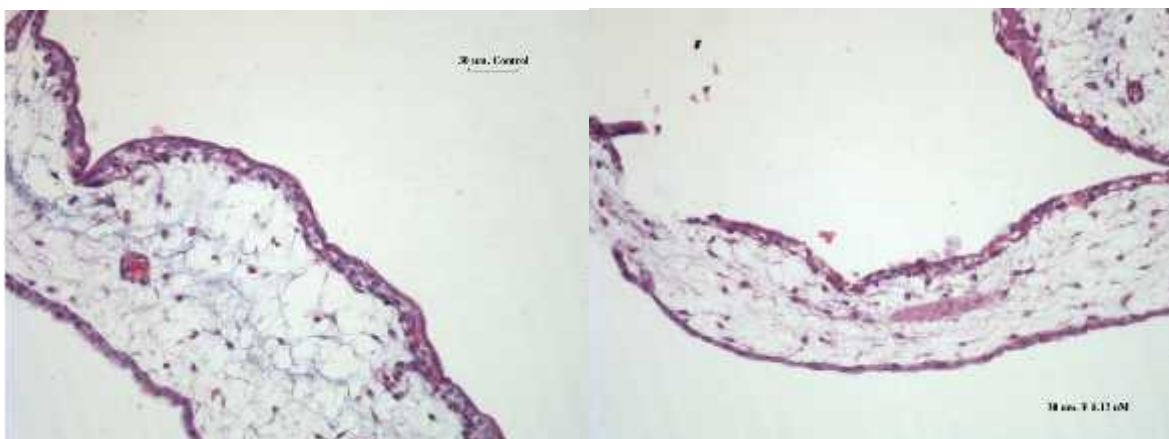


Figura 4: La instilación de enalapril en la concentración máxima utilizada determina una mayor en la migración vascular hacia el corion, lo que favorece el intercambio gaseoso.

Comparación entre la acción de aliskireno y enalapril en relación a los controles: Al hacer un corolario de los resultados obtenidos para cada fármaco en relación a su efecto sobre la angiogénesis respecto a los controles, se tiene que la adición de distintos medicamentos que actúan en una misma vía metabólica (el SRAA) genera efectos opuestos, con aliskireno ejerciendo un rol antiangiogénico, a diferencia de enalapril, cuya acción es proangiogénica. Es importante considerar que, en ambos casos, la significación estadística solo se alcanzó al utilizar las concentraciones máximas (Fig. 5).

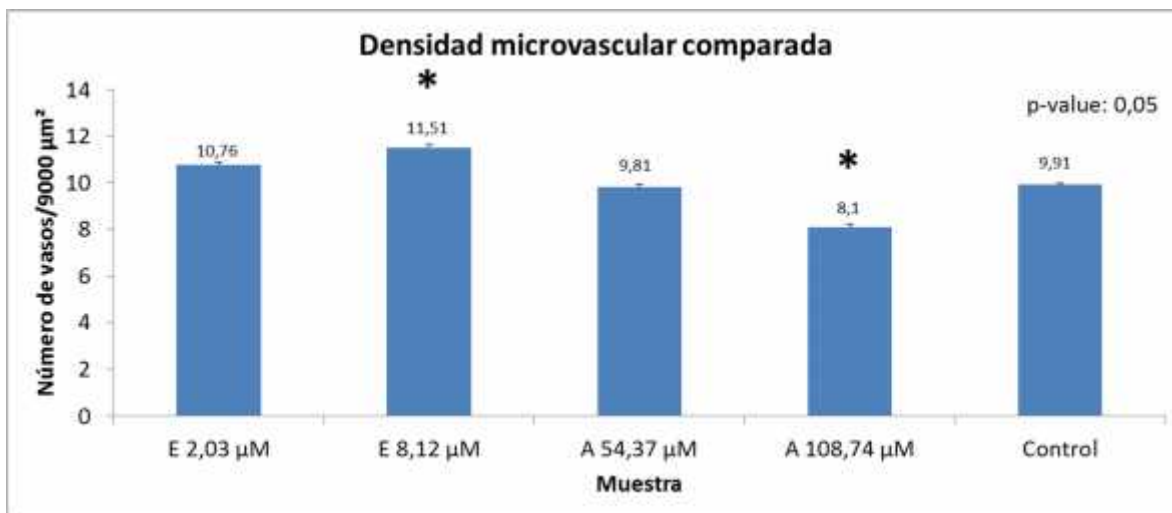


Figura n°5: Aliskireno, inhibidor directo de la renina, inhibe la angiogénesis en modelo de MAC, mientras que enalapril, un IECA, la favorece. Al comparar la acción de ambos fármacos en relación a los controles, los cambios solo son estadísticamente significativos cuando se instilaron en concentraciones máximas.

Análisis de Supervivencia Después de la Aplicación de Sustancias: Una vez realizada la instilación (día 10), y hasta la extracción de las MACs en crecimiento (día 13), se encontró sobrevida del total de receptores en los grupos control y aliskireno 54,37 μM . Al comparar el número total de receptores vivos al día 10 con el total de aquéllos restantes en el día 13, el análisis estadístico no arroja una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,40$). El estadístico utilizado fue el test de Mantel Cox (Fig 6).

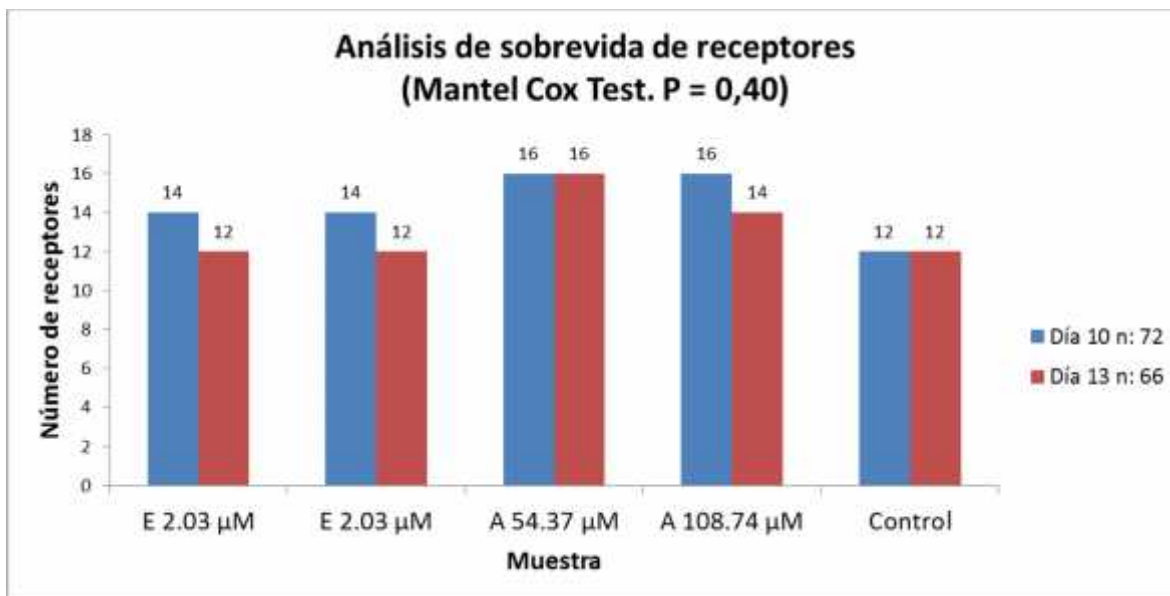


Figura 6: Análisis de Mantel Cox para sobrevida de receptores entre los días 10 y 13. La mortalidad total observada tras la instilación de fármacos no es estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

Al estudiar el efecto de aliskireno sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos, es posible afirmar que la acción antiangiogénica constatada es estadísticamente significativa solo al administrarse en la mayor concentración elevada. Es importante señalar, sin embargo, que este hallazgo se contrapone a los primeros estudios descritos en la literatura científica internacional, que señalan al aliskireno como un regulador positivo de fenómenos proangiogénicos en modelos de ratas (Pöss et al, 2010; Rusai et al, 2011). Sin embargo, y aun cuando estas experiencias fueron realizadas *in vivo*, es necesario considerar que existen diferencias metodológicas que podrían explicar las diferencias en los resultados alcanzados, tales como sujetos de estudio (ratas v/s embriones de pollo), modo de administración (vía oral o subcutánea v/s instilación directa en los vasos sanguíneos) y dosis utilizadas. Además, dichos estudios se basan en parámetros indirectos para evaluar la actividad angiogénica, tales como el número de células positivas para el VEGFR-2, o el

índice angiotensina I/angiotensina II. En relación a los resultados obtenidos en el presente estudio, se confirma la hipótesis de trabajo relativa al rol antiangiogénico de aliskireno, lo que sí es consistente para lo descrito previamente en relación a la acción de los inhibidores de AT1 (con la consecuente inhibición del SRAA), sobre la neoformación de vasos. Una posible explicación estaría dada por una mayor sensibilidad del eje ACE/angiotensinaII/AT1 a la inhibición, lo que generaría, aún en presencia de un agente inhibidor de ambos ejes del SRAA, un predominio relativo de la acción del eje ACE2/angiotensina (1-7)/Mas, con lo que se tendría un desbalance que finalmente desencadene una menor generación de citoquinas y factores de crecimiento, lo que se asocia a una menor migración y proliferación celular. Por otra parte, se tendría además un cese en la inhibición de factores de transcripción involucrados con la apoptosis. De este modo, se tendría finalmente el menor número de vasos de neoformación observado en este trabajo. Si se tiene en cuenta el resultado obtenido, podría plantearse una eventual nueva aplicación terapéutica para este fármaco, sin embargo, también es preciso señalar que las últimas investigaciones acerca de su uso en humanos han determinado que el uso de aliskireno debe ser supervisado estrictamente por el profesional a cargo, ya que en la actualidad se sabe que su uso asociado a IECA puede ser deletéreo a largo plazo en pacientes de alto riesgo cardiovascular, tales como portadores de hipertensión arterial y diabetes concomitante, con falla renal y factores de riesgo cardiovascular asociados (Parving et al, 2012), o bien asociado a mayor riesgo cardiovascular en pacientes con antecedentes recientes de síndrome coronario agudo tratados con aliskireno asociado o no a valsartan, en relación a placebo (Scirica et al, 2010). No obstante, también se ha documentado su efecto cardioprotector al asociarse a IECA, ARA II o - bloqueadores en pacientes con insuficiencia cardíaca (McMurray et al, 2008), así como su uso en monoterapia sin asociación demostró efecto renoprotector en pacientes hipertensos, diabéticos y con falla renal (Parving et al, 2008). Si bien actualmente su uso a largo plazo asociado o no a enalapril, en pacientes con falla cardíaca moderada a severa, se encuentra en estudio, sí es posible proyectar, a partir de la evidencia actual, su uso en monoterapia en pacientes con factores de riesgo cardiovascular estabilizados o en una etapa temprana, tales como hipertensión arterial etapa 1 o insuficiencia cardíaca capacidad II-III, siendo este grupo de pacientes potenciales beneficiarios de las propiedades antiangiogénicas de

aliskireno, en caso de asociar enfermedades crónicas no transmisibles que cursen con angiogénesis.

Respecto al efecto de enalapril sobre la angiogénesis en el modelo estudiado, se obtuvo un efecto proangiogénico, el que solo es significativo al administrarse en alta concentración. La literatura científica ha documentado la influencia de enalapril sobre este fenómeno, identificándolo como un regulador tanto negativo (Kim et al, 2009; Sharma et al, 2010) como positivo (Sánchez de Miguel et al, 2008; Fallahzadeh et al, 2010), a partir de trabajos en ratas. Nuevamente se señalan las diferencias metodológicas, tanto en sujetos de estudio, vía de administración y dosis suministrada a la hora de comparar las experiencias antes mencionadas con este trabajo. Una posible explicación para los resultados obtenidos podría encontrarse en una propiedad de la ACE no relacionada con el SRAA: esta enzima cataliza no solo la conversión de angiotensina I en angiotensina II, sino también la degradación de bradiquininas en péptidos inactivos. Las bradiquininas son péptidos fisiológicos producidos a partir de precursores llamados quinínógenos por acción de enzimas llamadas calicreínas, presentes en diversos sitios, tales como el páncreas, la próstata o la piel. Existen dos receptores para bradiquininas, B₁ y B₂, siendo este último el más importante en condiciones fisiológicas (Yazawa et al, 2011), mientras que B₁ se expresa en condiciones patológicas tales como inflamación o daño tisular. En relación con la angiogénesis, la unión de bradiquininas a sus receptores, principalmente B₂, estimula la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), y con ello, la liberación de óxido nítrico (NO), molécula que favorece tanto la secreción de VEGF como la expresión del VEGFR-2 (Ping et al, 2008). En consecuencia, en el presente trabajo, la mayor angiogénesis observada en los receptores tratados con enalapril se debería a la acción inhibitoria de la ACE que caracteriza a este fármaco, lo que da como resultado una acumulación de bradiquininas y una mayor migración y proliferación de células endoteliales por acción del NO.

Por otra parte, también es preciso explicar aspectos relativos a la metodología de trabajo. El modelo de trabajo utilizado, membrana alantocoriónica de pollo (MAC), fue elegido por presentar ventajas tales como ser económico, no requerir períodos prolongados de tiempo para realizar observaciones, ser no invasivo, sencillo, ser fácil de mantener en un

ambiente esterilizado, presentar una alta tasa de sobrevivencia de los individuos en estudio (en esta experiencia, cercana al 80%) y ser fácilmente reproducible. Además, al trabajar sobre organismos con un sistema inmune inmaduro, se descarta la posibilidad de una reacción de rechazo a las sustancias aplicadas sobre ellos, ya que los discos de metilcelulosa son instalados al décimo día de desarrollo, mientras que los linfocitos B, primeras células inmunes en aparecer, no son detectados antes del día 11 (Jaunse et al, 1991). Entre las desventajas de este modelo, se tiene en primer lugar, la ocurrencia de un fenómeno inflamatorio inespecífico asociado a la instalación del filtro de metilcelulosa sobre el cual se instalarán los fármacos, el que produce un aumento en el número de vasos sanguíneos locales que pueden amplificar falsamente el efecto angiogénico observado. Sin embargo, este fenómeno se da en todos los sujetos de estudio, por lo que se elimina un posible sesgo. Otro aspecto negativo de este modelo radica en que el aumento en el número de vasos sanguíneos observado puede deberse en realidad a reordenamiento de vasos sanguíneos ya presentes, y no a neoformación. Nuevamente, la ocurrencia de este proceso en todos los sujetos ayuda a limitar otro posible sesgo. En el caso particular de este estudio, una dificultad estaba dada por la instilación de enalapril, fármaco que es ingerido por el ser humano como profármaco, a diferencia de aliskireno, que se administra como principio activo. Sin embargo, en el embrión de pollo, ya en la primera semana se tiene un sistema digestivo funcional, lo que se demuestra en la capacidad de tomar nutrientes a partir del saco vitelino y formar productos de desecho que se almacenan en el alantoides. De este modo, se tiene también un hígado capaz de metabolizar el profármaco administrado, tal como sucede en el ser humano. Del mismo modo, en relación al modelo de MAC, y para refrendar su validez, es necesario mencionar el extendido uso que ha tenido en el estudio de tanto de fenómenos tanto patológicos como fisiológicos, contándose entre los primeros angiogénesis tumoral, (Ribatti, 2004), mieloma múltiple (Vacca et al, 1994) o neuroblastoma humano (Cañete et al, 2000); y entre los segundos, la cicatrización (Ribatti et al, 1996).

El uso de agua se debe a que aliskireno, fármaco en estudio, es descrito como altamente soluble en este medio, por lo que se decidió utilizar este solvente. Si bien el uso de PBS o suero fisiológico está ampliamente difundido como un modo de proteger estructuras vivas manteniéndolas en un medio isotónico, existe un trabajo previo realizado

en preparados histológicos de MAC tratados con agua que arrojó un porcentaje de supervivencia cercano al 80%, tal como en el presente estudio. La ausencia de significación estadística al estudiar la mortalidad de receptores después del día 10, esto es, después de la aplicación de solución acuosa con o sin fármaco, permite afirmar que, en la dosis utilizada, el uso de solución acuosa es seguro y no se asocia a daño ni mortalidad en los receptores.

Por último, al elegir las concentraciones utilizadas al instilar cada fármaco, se tuvo como referencia las concentraciones aproximadas de cada fármaco al ser ingeridas dentro de sus respectivos rangos terapéuticos en la práctica clínica habitual en humanos. Desde luego, es imposible pretender que el modelo de MAC replique con exactitud la ingesta de humanos adultos, sin embargo, se espera, a partir de los resultados obtenidos, plantear eventuales nuevas aplicaciones para el uso de aliskireno, cuya factibilidad sería mayor al estar las dosis administradas dentro de lo aceptado en la práctica terapéutica. El uso de solo dos concentraciones no permite estudiar en profundidad el efecto de aliskireno y enalapril, ya que no es posible establecer patrón alguno, sea éste lineal, exponencial, en “U”, o de otro tipo, que relacione dosis y efecto. Sin embargo, éste no constituía un objetivo del presente trabajo, por lo que se requieren nuevos estudios destinados a esta finalidad.

En suma, el presente trabajo confirma la hipótesis planteada respecto al efecto antiangiogénico de aliskireno en un modelo de fácil acceso que ha demostrado ser simple, replicable y válido. Los resultados obtenidos abren la puerta a nuevas líneas de investigación que se espera que permitan dilucidar, entre otros aspectos, los mecanismos subyacentes y las proyecciones que la interacción entre aliskireno y angiogénesis pueda ofrecer en relación a la terapéutica en seres humanos.

CONCLUSIONES

Aliskireno tiene un efecto inhibitorio de la angiogénesis, lo que está podría estar determinado por la inhibición que ejerce sobre el eje ACE/Angiotensina II/AT1. Por lo tanto, su uso podría ser un factor protector en el contexto de patologías crónicas que cursen con angiogénesis.

Enalapril favorece la angiogénesis, lo que podría estar mediado por una activación del eje bradiquininas-óxido nítrico, con un aumento en los niveles plasmáticos de bradiquininas, mayor liberación de NO y expresión de VEGF y VEGFR-2. En consecuencia, su uso podría ser recomendable en condiciones que requieran angiogénesis, tales como la isquemia o el daño tisular.

Se requieren nuevos estudios para determinar con exactitud la relación entre los fármacos estudiados y la angiogénesis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ager E, Neo J, Cristophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis*. 2008 Sep;29(9):1675-84.
- 2.- Albrecht D. Angiotensin-(1-7)-induced plasticity changes in the lateral amygdala are mediated by COX-2 and NO. *Learn Mem*. 2007 Mar 8;14(3):177-84.
- 3.- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
- 4.- Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(12):932-43.
- 5.- Boodhwani M, Mieno S, Voisine P, Feng J, Sodha N, Li J, Sellke FW. High-dose atorvastatin is associated with impaired myocardial angiogenesis in response to vascular endothelial growth factor in hypercholesterolemic swine. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Dec;132(6):1299-306.

- 6.- Boodhwani M, Nakai Y, Voisine P, Feng J, Li J, Mieno S, Ramlawi B, Bianchi C, Laham R, Sellke FW. High-dose atorvastatin improves hypercholesterolemic coronary endothelial dysfunction without improving the angiogenic response. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I402-8.
- 7.- Boulanger E, Grossin N, Wautier MP, Taamma R, Wautier JL. Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation. *Kidney Int*. 2007 Jan;71(2):126-33.
- 8.- Browder T, Butterfield CE, Kraling BM. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res*. 2000 60:1878-1886.
- 9.- Brown, MJ. Aliskiren. *Circulation* 2008;118: 773-784.
- 10.- Buharalioglu CK, Song CY, Yaghini FA, Ghafoor HU, Motiwala M, Adris T, Estes AM, Malik KU. Angiotensin II-induced process of angiogenesis is mediated by spleen tyrosine kinase via VEGF receptor-1 phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Sep;301(3):H1043-55
- 11.- Buczko, W, Hermanowicz J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren, an oral direct renin inhibitor. *Pharmacol Rep*. 2008;60(5):623-631.
- 12.- Burgelova M, Kramer HJ, Teplan V, Velicková G, Vítko S, Heller J, Malý J, Cervenka L. Intrarenal infusion of angiotensin-(1-7) modulates renal functional responses to exogenous angiotensin II in the rat. *Kidney Blood Press Res*. 2002;25(4):202-10.
- 13.- Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene*. 2008 Apr 7;27(16):2276-88.
- 14.- Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol*. 1989 Jul;257(1 Pt 2):H324-9.
- 15.- Cañete A, Navarro S, Bernardez J, et al. Angiogenesis in neuroblastoma: relationship to survival and other prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients. *J Clin Oncol* 2000;18:27-34.
- 16.- Celik I, Sürücü O, Dietz C. Therapeutic efficacy of endostatin inhibits a bi-phasic dose response curve. *Cancer Res*. 2001 61:7669-7674.
- 17.- Chadeaux B, Ceballos I, Hamet M. Is absence of atheroma in Down syndrome due to decreased homocysteine levels? *Lancet* 1998 352:407-409.

- 18.- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimbgruber RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989 84:1470– 1478.
- 19.- Crum R, Szabo S, Folkman J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science* 1985 230:1375-1378.
- 20.- Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2005 Dec;5(12):930-942.
- 21.- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000 Sep 1;87(5):E1-9.
- 22.- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998 110:2065–2077.
- 23.- Fallahzadeh AR, Khazaei M, Sharifi MR. Restoration of angiogenesis by enalapril in diabetic hindlimb ischemic rats. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Jun;155(2):137-42.
- 24.- Fernandez HA, Kallenbach K, Seghezzi G, Grossi E, Colvin S, Schneider R, Mignatti P, Galloway A. Inhibition of endothelial cell migration by gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Surg Res* 1999 82:156–162.
- 25.- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004 25:581-611.
- 26.- Ferrara N, Kerbel R. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005 438:967-974.
- 27.- Ferrario CM, Martell N, Yunis C, Flack JM, Chappell MC, Brosnihan KB, Dean RH, Fernandez A, Novikov SV, Pinillas C, Luque M. Characterization of angiotensin-(1-7) in the urine of normal and essential hypertensive subjects. *Am J Hypertens.* 1998 Feb;11(2):137-46.
- 28.- Ferreira AJ, Santos RA. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 2005 Apr;38(4):499-507.
- 29.- Folkmann, J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 2006. 57:1-18.
- 30.- Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 1983 221:719–725.

- 31.- Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, Murphy AJ, Adams NC, Lin HC, Holash J, Thurston G, Yancopoulos GD. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(45):15949-54.
- 32.- George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2010 Nov;10(11):745-759.
- 33.- Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002 417:954–958.
- 34.- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998 273:30336–30343.
- 35.- Giani JF, Mayer MA, Muñoz MC, Silberman EA, Höcht C, Taira CA, Gironacci MM, Turyn D, Dominici FP. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Feb;296(2):E262-71.
- 36.- Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 86:7311–7315.
- 37.- Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987 8:95–114. (10)
- 38.- Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006 Jan 13;124(1):175-89.
- 39.- Habibi J, Whaley-Conell A, Hayden MR, DeMarco VG, Schneider R, Sowers SD, Karuparthi P, Ferrario CM, Sowers JR. Renin inhibition attenuates insulin resistance, oxidative stress, and pancreatic remodeling in the transgenic Ren 2 rat. *Endocrinology* 2008; 149: 5643-53.
- 40.- Hao Q, Chen Y, Zhu Y, Fan Y, Palmer D, Su H, Young WL, Yang GY. Neutrophil depletion decreases VEGF-induced focal angiogenesis in the mature mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Nov;27(11):1853-60.
- 41.- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999 79:1283–1316.

- 42.- Hellstrom M, Kal NM, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR- in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 1999 126:3047–3055.
- 43.- Hiratsuka S. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002 2:289–300.
- 44.- Imhof BA, Aurrand-Lions M. Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med.* 2006;12(2):171-2.
- 45.- Ito S, Nakura N, Le Breton S, Keefe D. Efficacy and safety of aliskiren in Japanese hypertensive patients with renal dysfunction. *Hypertension Research* 2010;33: 62–66.
- 46.- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):685-93.
- 47.- Jakobisiak M, Golab J. Potential antitumor effects of statins. *Int J Oncol.* 2003 Oct;23(4):1055-69.
- 48.- Janse EM, Jeurissen SH. Ontogeny and function of two non-lymphoid cell populations in the chicken embryo. *Immunobiology.* 1991 Aug;182(5):472-81.
- 49.- Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 92: 3566–3570.
- 50.- Kaushal V, Kohli M, Mehta P, Mehta JL. Potential anticancer effects of statins: fact or fiction? *Endothelium* 2003;10(1):49-58.
- 51.- Kerbel R. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-2049.
- 52.- Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(10):727-39.
- 53.- Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 1998 273:15099–15103.
- 54.- Kim HW, Kim JL, Lee HK, Hur DY, Yun IH, Kim SD. Enalapril alters expression of key growth factors in experimental diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2009 Nov;34(11):976-87.
- 55.- Koka V, Wang W, Huang XR, Kim-Mitsuyama S, Truong LD, Lan HY. Advanced Glycation End Products Activate a Chymase-Dependent Angiotensin II-Generating Pathway in Diabetic Complications. *Circulation* 2006;113:1353-1360.

- 56.- Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 98:4605-4610.
- 57.- Lin EY, Pollard JW. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res*. 2007 1;67(11):5064-6.
- 58.- Lindahl P, Johansson B, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 1997 277:242–245.
- 59.- Lobb RR, Alderman EM, Fett JW. Induction of angiogenesis by bovine brain derived class 1 heparin-binding growth factor. *Biochemistry* 1985 24:4969–4973.
- 60.- Logson CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T. RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med*. 2007 Dec;7(8):777-89.
- 61.- Lubel JS, Herath CB, Tchongue J, Grace J, Jia Z, Spencer K, Casley D, Crowley P, Sievert W, Burrell LM, Angus PW. Angiotensin-(1-7), an alternative metabolite of the renin-angiotensin system, is up-regulated in human liver disease and has antifibrotic activity in the bile-duct-ligated rat. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Sep 14;117(11):375-86.
- 62.- McMurray JV, Pitt B, Latini R, Maggioni A, Solomon S, Keefe D, Ford J, Verma A, Lewsey J, and Alisiren Observation of Heart Failure Treatment (ALOFT) Investigators. Effects of the Oral Direct Renin Inhibitor Aliskiren in Patients With Symptomatic Heart Failure. *Circ Heart Fail* 2008;1: 17-24.
- 63.- Ma FX, Han ZC. Statins, nitric oxide and neovascularization. *Cardiovasc Drug Rev*. 2005 Winter;23(4):281-92.
- 64.- Machado RD, Santos RA, Andrade SP. Mechanisms of angiotensin-(1-7)-induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Apr;280(4):R994-R1000.
- 65.- Maeshima Y, Colorado PC, Torre A. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem*. 2000 275:21340-48.
- 66.- Michel P, Medina E, Lemus D, Sinning M. Actividad angiogénica comparada de líquido cefalorraquídeo de pacientes con tumores primarios del Sistema Nervioso Central. *ANACEM* 2011 5(1): 12-16.
- 67.- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGFbinding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993 72:835–846.

- 68.- Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 2000 20:2260–2268.
- 69.- Miller KD. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 23:792–799.
- 70.- Molina MC, Ferreira V, Valck C, Aguilar L, Orellana J, Rojas A, Ramirez G, Billetta R, Schwaeble W, Lemus D, Ferreira A. An in vivo role for Trypanosoma cruzi calreticulin in antiangiogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 2005 Apr;140(2):133-40.
- 71.- Nakamura K, Yamagishi S, Nakamura Y, Takenaka K, Matsui T, Jinnouchi Y, Imaizumi T. Telmisartan inhibits expression of a receptor for advanced glycation end products (RAGE) in angiotensin-II-exposed endothelial cells and decreases serum levels of soluble RAGE in patients with essential hypertension. *Microvasc Res*. 2005 Nov;70(3):137-41.
- 72.- Norrby K. In vivo models of angiogenesis. *J Cell. Mol. Med*. 2006;10: 588-612.
- 73.- Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 15;103(33):12493-8.
- 74.- Oellerich MF, Potente M. FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging. *Circ Res*. 2012 Apr 27;110(9):1238-51.
- 75.- Okamoto T, Tanaka S, Stan AC, Koike T, Kase M, Makita Z, Sawa H, Nagashima K. Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo. *Microvasc Res*. 2002 Mar;63(2):186-95.
- 76.- Papetti M, Herman I. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 282:947-970.
- 77.- Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, Chaturvedi N, Persson F, Desai AS, Nicolaidis M, Richard A, Xiang Z, Brunel P, Pfeffer MA; ALTITUDE Investigators. Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2012 Dec 6;367(23):2204-13.
- 78.- Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK; AVOID Study Investigators. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2008 Jun 5;358(23):2433-46.
- 79.- Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RA. Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Apr;124(7):443-56.

- 80.- Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997 8:21–43.
- 81.- Pinheiro S, Simoes A. Angiotensin converting enzyme 2, angiotensin-(1–7), and receptor MAS axis in the kidney. *International Journal of Hypertension* 2012 Article ID 414128.
- 82.- Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Okumura K, Murohara T. Role of bradykinin, nitric oxide, and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension*. 2008 Feb;51(2):252-8.
- 83.- Pöss J, Werner C, Lorenz D, Gensch C, Böhm M, Laufs U. The renin inhibitor aliskiren upregulates pro-angiogenic cells and reduces atherogenesis in mice. *Basic Res Cardiol*. 2010 Nov;105(6):725-35 .
- 84.- Rak J. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 1995 55:4575–4580.
- 85.- Ribatti D. The first evidence of the tumor-induced angiogenesis in vivo by using the chorioallantoic membrane assay. *Leukemia* 18: 1350-1351.
- 86.- Ribatti D, Vacca A, Ranieri G. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo wound healing model. *Pathol Res Pract* 1996;192: 1068-1076.
- 87.- Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J*. 2004 October 1; 383(Pt 1): 45–51.
- 88.- Rusai K, Jianxing C, Schneider R, Struijker-Boudier H, Lutz J, Heemann U, Baumann M. Renin inhibition mitigates anti-angiogenesis in spontaneously hypertensive rats J *Hypertens*. 2011 Feb;29(2):266-72.
- 89.- Safran M, Kaelin WJ Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest*. 2003 111:779–783.
- 90.- Sánchez de Miguel L, Neysari S, Jakob S, Petrampil M, Butz N, Banfi A, Zaugg C, Humar R, Battagay E. B2-kinin receptor plays a key role in B1-, angiotensin converting enzyme inhibitor-, and vascular endothelial growth factor-stimulated in vitro angiogenesis in the hypoxic mouse heart. *Cardiovascular Research* (2008) 80, 106–113.
- 91.- Santos SH, Braga JF, Mario EG, Pôrto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, Botion LM, Alenina N, Bader M, Santos RA. Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 May;30(5):953-61.

- 92.- Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 1988 Feb;11(2 Pt 2):I153-7.
- 93.- Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol*. 2013 Jan 18;216(2):R1-R17.
- 94.- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8258-63.
- 95.- Sasahira T, Kirita T, Bhawal UK, Ikeda M, Nagasawa A, Yamamoto K, Kuniyasu H. The expression of receptor for advanced glycation end products is associated with angiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2007 Mar; 450(3):287-95.
- 96.- Satchi-Fainaro R, Mamluk R, Wang L. Inhibition of vessel permeability by TNP-470 and its polymer conjugate, caplostatin. *Cancer Cell* 2005 7:251-261.
- 97.- Satchi-Fainaro R, Puder M, Davies JW. Targeting angiogenesis with a conjugate of HEMA copolymer and TNP-470. *Nat Med*. 2004 10:255-261.
- 98.- Sato T, Wu X, Shimogaito N, Takino J, Yamagishi S, Takeuchi M. Effects of high-AGE beverage on RAGE and VEGF expression in the liver and kidneys. *Eur J Nutr*. 2009 Feb;48(1):6-11.
- 99.- Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 June; 85(11): 4095–4098.
- 100.- Scirica BM, Morrow DA, Bode C, Ruzyllo W, Ruda M, Oude Ophuis AJ, Lopez-Sendon J, Swedberg K, Ogorek M, Rifai N, Lukashevich V, Maboudian M, Cannon CP, McCabe CH, Braunwald E. Patients with acute coronary syndromes and elevated levels of natriuretic peptides: the results of the AVANT GARDE-TIMI 43 Trial. *Eur Heart J*. 2010 Aug;31(16):1993-2005.
- 101.- Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 94:13612–13617.

- 102.- Shafiq M, Menon D, Victor R. Oral Direct Renin Inhibition: Premise, Promise, and Potential Limitations of a New Class of Antihypertensive Drug. *Am J Med.* 2008 April ; 121(4): 265–271.
- 103.- Shaked Y, Bertolini F, Man S, Rogers MS, Cervi D, Foutz T, Rawn K, Voskas D, Dumont DJ, Ben-David Y, Lawler J, Henkin J, Huber J, Hicklin DJ, D`Amato RJ, Kerbel RS. Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell.* 2005 Jan;7(1):101-11.
- 104.- Sharma A, Bettis D, Cowden J, Mohan R. Localization of angiotensin converting enzyme in rabbit cornea and its role in controlling corneal angiogenesis in vivo. *Molecular Vision* 2010; 16:720-728.
- 105.- Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y, Fraga-Silva RA, Díez-Freire C, Dooies A, Jun JY, Sriramula S, Mariappan N, Pourang D, Venugopal CS, Francis J, Reudelhuber T, Santos RA, Patel JM, Raizada MK, Katovich MJ. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Oct 15;182(8):1065-72.
- 106.- Skaletz-Rorowski A, Kureishi Y, Shiojima I, Walsh K. The pro-and antiangiogenic effects of statins. *Semin Vasc Med.* 2004 Nov;4(4):395-400.
- 107.- Skaletz-Rorowski A, Walsh K. Statin therapy and angiogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2003 Dec;14(6):599-603.
- 108.- Sund M, Hamano Y, Sugimoto H. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 102:2934-39.
- 109.- Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol* 1985 101:2330–2334.
- 110.- Thomas KA. Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1987 1:434–440.
- 111.- Toledo V, Ramírez G, Valck C, López N, Ribeiro C, Maldonado I, Aguilar L, Lemus D, Ferreira A. Comparative in vivo antiangiogenic effects of calreticulin from *Trypanozoma cruzi* and *homo sapiens sapiens*. *Biol Res.* 2010;43(3):287-9.
- 112.- Tsuji A, Wakisaka N, Kondo S, Muroso S, Furukawa M, Yozhisaki T. Induction of receptor for advanced glycation end products by EBV latent membrane protein 1 and its correlation with angiogenesis and cervical lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008 Sep 1;14(17):5368-75.

- 113.- Vacca A, Ribatti D, Roncali L, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 87:503-508.
- 114.- Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002 Apr 26;277(17):14838-43.
- 115.- Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, Cybulsky M. Advanced glycation end products promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med.* 1995;1:447-456.
- 116.- Waldmeier F, Glaenzel U, Wirz B, Oberer L, Schmid D, Seiberling M, Valencia J, Riviere GJ. Absorption, distribution, metabolism, and elimination of the direct renin inhibitor aliskiren in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos.* 2007;35: 1418 -1428.
- 117.- Wautier JL, Schmidt AM. Protein Glycation: A Firm Link to Endothelial Cell Dysfunction. *Circ Res.* 2004;95:233-238.
- 118.- Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002 Feb 12;105(6):739-45.
- 119.- Wey JS. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer* 2005 104:427-438.
- 120.- Yamagishi SI, Matsui T, Nakamura K, Inoue H, Takeuchi M, Ueda S, Fukami K, Okuda S, Imaizumi T. Olmesartan blocks advanced glycation end products (AGEs)-induced angiogenesis in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. *Microvasc Res.* 2007 May 18.
- 121.- Yazawa H, Miyachi M, Furukawa M, Takahashi K, Takatsu M, Tsuboi K, Ohtake M, Murase T, Hattori T, Kato Y, Murohara T, Nagata K. Angiotensin-converting enzyme inhibition promotes coronary angiogenesis in the failing heart of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *J Card Fail.* 2011 Dec;17(12):1041-50.
- 122.- Zhang Y, Lu J, Shi J, Lin X, Dong J, Zhang S, Liu Y, Tong Q. Central administration of angiotensin-(1-7) stimulates nitric oxide release and upregulates the endothelial nitric oxide synthase expression following focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neuropeptides.* 2008 Oct-Dec;42(5-6):593-600.
- 123.- Zúñiga J, Fuenzalida M, Guerrero A, Illanes J, Dabancens A, Díaz E, Lemus D. Effects of steroidal and non steroidal drugs on the neo vascularization response induced by tumoral TA3 supernatant on CAM from chick embryo. *Biol Res.* 2003; 36:233-240.