

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***HISTATINA-1 PROMUEVE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS
ENDOTELIALES MEDIANTE LA UNIÓN Y ACTIVACIÓN DEL
RECEPTOR DE VEGF TIPO 2***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctor en Farmacología por:

CARLOS SIMÓN MATELUNA FLORES

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Vicente Torres Gómez".

Director de Tesis: Dr. Vicente A. Torres Gómez

Santiago-CHILE

Marzo 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Carlos Simón Mateluna Flores

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:
Dr. VICENTE A. TORRES GÓMEZ



Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. LYSETTE LEYTON

Dr. GUILLERMO DIAZ.

Dr. LEONEL ROJO

Dr. MARIO CHIONG

Esta Tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD), Facultad de Odontología, Universidad de Chile, y fue posible gracias a los siguientes proyectos y becas:

1. Proyecto FONDECYT #1220517.
2. Iniciativa Milenio, ANID (ICN09_016/ICN 2021_045)
3. ACCDiS FONDAP 15130011.
4. Beca ANID 21181094

Financiamiento otorgado a Carlos Mateluna Flores.

- Beca para estudiantes Doctorado Nacional otorgada por Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) en la postulación al Doctorado en Farmacología. Año 2018-2022.
- Beca Gastos Operacionales para estudiantes de Doctorado Nacional otorgada por Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT). Año 2020-2021.

Producción científica desarrollada durante el periodo del doctorado en Farmacología asociada a este trabajo de tesis.

1. Carlos Mateluna, Pedro Torres, Marcelo Rodríguez–Peña, Patricio Silva, Douglas J. Matthies, Alfredo Criollo, Floris J. Bikker, Jan G.M. Bolscher, Christian A.M. Wilson, Gerald Zapata–Torres, Vicente A. Torres, **Identification of VEGFR2 as the Histatin-1 receptor in endothelial cells**, *Biochemical Pharmacology*, Volume 201, 2022, 115079, ISSN 0006-2952, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115079>.
2. Torres, P., Hernández, N., Mateluna, C., Silva, P., Reyes, M., Solano, L., Venegas, S., Criollo, A., Nazmi, K., Bikker, F.J., Bolscher, J.G.M., Garrido, M., Cáceres, M. and Torres, V.A. (2021), **Histatin-1 is a novel osteogenic factor that promotes bone cell adhesion, migration, and differentiation**. *J Tissue Eng Regen Med*, 15: 336-346. <https://doi.org/10.1002/term.3177>

Producción científica desarrollada durante el periodo del doctorado en Farmacología sin asociación a este trabajo de tesis.

1. Luraschi Roberto, Santibáñez Álvaro, Barrera-Avalos Carlos, Vallejos-Vidal Eva, Mateluna-Flores Carlos, Alarcón Javiera, Cayunao Javiera, Mella-Torres Andrea, Hernández Felipe, Inostroza-Molina Ailen, Valdés Daniel, Imarai Mónica, Acuña-Castillo Claudio, Reyes-López Felipe E., Sandino Ana María. **Evaluation and comparison of the sensitivity of three commercial RT-qPCR kits used for the detection of SARS-CoV-2 in Santiago, Chile**. *Frontiers in Public Health*, Volume 10, 2022. 10.3389/fpubh.2022.1010336
2. Barrera-Avalos Carlos, Mena Javier, Luraschi Roberto, Rojas Patricio, Mateluna-Flores Carlos, Vallejos-Vidal Eva, Imarai Mónica, Sandino Ana María, Valdés Daniel, Vera Rodrigo, Hernández Iván, Reyes-López Felipe E., Acuña-Castillo Claudio. **Sensitivity analysis of rapid antigen tests for the Omicron SARS-CoV-2 variant detection from nasopharyngeal swab samples collected in Santiago of Chile**. *Frontiers in Public Health*. Volume 10, 2022. 10.3389/fpubh.2022.976875
3. Barrera-Avalos, C, Luraschi, R, Vallejos-Vidal, E, Mateluna, Carlos, et al. **Analysis by real-time PCR of five transport and conservation mediums of nasopharyngeal swab samples to COVID-19 diagnosis in Santiago of Chile**. *J Med Virol*. 2022; 94: 1167- 1174. doi:10.1002/jmv.27446

Dedico esta tesis a mi familia, pareja y amigos, los pilares de mi vida.

Agradecimientos

Ha sido un camino muy largo, pero finalmente se ha cumplido un ciclo y nada de esto hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia. Quiero agradecer a mi papá, Juan Carlos, por traer comida a nuestro hogar, nunca nos faltó nada, permitiéndonos dedicar nuestras preocupaciones exclusivamente a lo que siempre nos repetía: estudiar, estudiar y estudiar. Agradezco a mi mamá, María Magdalena, por siempre priorizar nuestra salud por encima de la suya, por darnos la comodidad del hogar, siempre tenernos un plato de comida y ropa limpia, y por su inmensa preocupación. Y a mi hermana, por estar siempre pendiente de los pequeños logros que fueron surgiendo a lo largo de este trabajo. Espero que este logro también te dé ánimos en tus actuales metas.

A mi acompañante de vida, mi pareja Débora Morán, gracias por estar siempre a mi lado, quien nunca dudó en que yo podría superar esta etapa y por tu incondicional amor, a pesar de que muchas veces los tiempos para dedicarnos a nosotros eran acotados. Gracias por soportar todos los cambios de ánimo, quejas y llantos. Si superamos esta etapa juntos, no creo que haya nada que nos pueda superar. Te amo.

Agradezco a mi tutor, el Dr. Vicente Torres, quien ha sido más que un tutor para mí, ha sido un padre científico y un amigo en muchas ocasiones. Es una persona realmente admirable tanto en lo académico como en lo personal. Estoy inmensamente agradecido por la confianza y por creer en mí como científico, así como por su enorme paciencia y el tiempo que dedicó a esta tesis. Mis más sinceros agradecimientos.

A mi segunda familia, el laboratorio, a todos mis compañeros: Nadia, Pato, Pedro, Tito, Ale, Luis, Seba, y especialmente a mis amigas Tania y Daniela. Los años de pandemia no hubieran sido lo mismo sin ustedes. Son un pilar importante en

mi vida científica y personal. Gracias por siempre escucharme, por su preocupación y por esas papas y cervezas terapéuticas.

También quiero agradecer a mi mejor amigo, a mi incondicional Dr. Emanuel Guajardo. Creo que sabes lo importante que has sido y seguirás siendo en mi vida. Gracias por siempre estar ahí, por los consejos, por las risas y por el cariño que ha perdurado a lo largo de todos estos años. Comenzamos juntos en el pregrado y terminamos el postgrado del mismo modo. Estoy ansioso por saber todas las nuevas experiencias que nos quedan por compartir.

A mis amigos y fuente inagotable de ánimo, en especial a los Aletines: Ale, Diego, Pipe, Mati, Douglas, Pelao, Roboto, Harry, Papo, Seba, Calu, Javier y nuevamente Ema. Siempre estuvieron dándome ánimo cuando más necesité apoyo. Cuando estuve más de alguna vez a punto de rendirme, fueron ustedes los que me levantaron. Les agradezco desde lo más profundo de mis sentimientos todo el cariño que he recibido de ustedes. Los quiero. Dentro de mis amigos, una mención honrosa a mi grupo de Yugi, Douglas, Papo y Mati-Nati. Han sido mis terapias y mi escape al estrés. No saben cómo han contribuido a mi paz mental y emocional. Gracias.

Gracias a mis amigos Yvo, Pedro y Amarilis. Hicieron muy amena mi estadía durante el doctorado. Gracias por su apoyo, por sus consejos y por las conversaciones y experiencias que compartimos.

Agradecer a los colaboradores de este trabajo. Sin ellos, esta tesis jamás habría visto la luz, que vio enfrentado una crisis social y una pandemia.

Finalmente, agradecer a la Comisión de esta tesis por sus consejos y críticas constructivas, también por su positiva disposición para que este trabajo pudiese finalizar con éxito.

ÍNDICE

I. RESUMEN	11
ABSTRACT	12
II. INTRODUCCIÓN	13
REPARACIÓN DE HERIDAS.....	13
FASES DE LA REPARACIÓN DE HERIDAS	13
FACTORES QUE AFECTAN LA REPARACIÓN DE HERIDAS.	15
MIGRACIÓN CELULAR EN LA REPARACIÓN DE HERIDA.....	19
REPARACION DE HERIDA EN LA CAVIDAD ORAL	20
HISTATINAS	22
CÉLULAS ENDOTELIALES Y ANGIOGÉNESIS	24
RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y VEGF	25
Resumen de antecedentes	29
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS	30
IV.1. Objetivo general	30
IV.2. Objetivos específicos	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
V.1. Histatina-1	31
V.2. Cultivo celular	31
V.3. Ensayo de migración en cámara de Boyden o Transwell.....	32
V.4. Silenciamiento de VEGFR-2.....	32
V.5. Extracción de proteínas	33
V.6. Western Blot.....	33
V.7. Inmunoprecipitación	34
V.8. Pulldown.....	34
V.9. Inmunofluorescencia [Colaboración Dr. Patricio Silva].....	35
V.10. Ensayo de ligación por proximidad (PLA) [Colaboración Dr. Patricio Silva].....	36
V.11. Pinzas Ópticas [Colaboración Dr. Christian Wilson]	36
V.12. Modelamiento molecular [Colaboración Dr. Gerald Zapata, Douglas Matthies]	37
V.13. Docking molecular [Colaboración Dr. Gerald Zapata, Douglas Matthies].....	37
V.14. Dinámica molecular [Colaboración Dr. Gerald Zapata, Douglas Matthies]	38
V.15. Análisis estadístico.....	38
VI. RESULTADOS	39

VI.1. Objetivo específico 1	39
VI.1.1. Inhibición farmacológica de VEGFR2.	39
VI.1.2. Silenciamiento de VEGFR-2 en células endoteliales.	40
VI.1.3. Inhibición de VEGFR-2 en distintos tipos celulares.	42
VI.2. Objetivo específico 2	45
VI.2.2 Fosforilación de ERK 1/2 y p38 en células endoteliales estimuladas con histatina-1	46
VI.3. Objetivo específico 3	48
VI.3.1. Co-localización entre histatina-1 y VEGFR-2	48
VI.3.2. Ensayo de ligación por proximidad (PLA)	50
VI.3.3. Inmunoprecipitación de VEGFR-2.....	51
VI.3.4. Pulldown de histatina-1 y VEGFR-2.....	53
VI.3.5. Ensayo de pinzas ópticas entre VEGFR-2 e histatina-1	55
VI.3.6. Modelamiento molecular de la interacción entre histatina-1 y VEGFR-2.....	57
VI.4. Objetivo específico 4	60
VI.4.1. Dinámica molecular de la mutante triple alanina de histatina-1	60
VI.4.2. Efecto de la mutación F26A/Y30A/Y34A en la unión de histatina-1 y VEGFR2 <i>in vitro</i>	62
VI.4.3. Efecto de la mutación F26A/Y30A/Y34A en la migración celular endotelial y la tubulogénesis inducida por histatina-1	63
VII. DISCUSIÓN	65
VIII. CONCLUSIÓN.....	72
IX. REFERENCIAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de la reparación de herida.....	15
Figura 2. Biología de la herida crónica.....	17
Figura 3. Biología de la fibrosis	19
Figura 4. Secuencia aminoacídica de histatinas.	24
Figura 5. Isoformas de VEGF y VEGFR.....	26
Figura 6. Cristalización e interacción de VEGF-A con VEGFR2.	27
Figura 7. Alineamiento entre histatina-1 y VEGF-A.	27
Figura 8. VEGFR-2, estructura y señalización	28
Figura 9. Efecto del inhibidor específico de VEGFR-2, ZM323881, en la migración celular endotelial inducida por histatina-1.	40
Figura 10. Estandarización de siRNA en células EA.hy926 para el silenciamiento de VEGFR-2	41

Figura 11. Efecto de histatina-1 en células endoteliales silenciadas con siRNA contra VEGFR-2.	42
Figura 12. Efecto de histatina-1 en la migración de HUVEC y OKF6.	44
Figura 13. Fosforilación de VEGFR-2 en el residuo Y801 inducido por Hist-1.	46
Figura 14. Fosforilación de p38 y ERK 1/2.....	47
Figura 15. Co-localización de VEGFR-2 e histatina-1 en células endoteliales.	49
Figura 16. Ensayo de ligación por proximidad entre histatina-1 y VEGFR-2 en células endoteliales	51
Figura 17. Inmunoprecipitación de VEGFR-2.....	52
Figura 18. Pulldown de histatina-1 y VEGFR-2 puros.	54
Figura 19. Interacción proteína-proteína entre histatina-1 y VEGFR-2 en pinzas ópticas.....	56
Figura 20. Modelamiento estructural 3D de histatina-1, VEGF-A y dominio D2-D3 de VEGFR-2	58
Figura 21. Interacción entre histatina-1 y VEGFR-2.	59
Figura 22. Dinámica molecular de histatina-1.	61
Figura 23 Pulldown de histatina-1 ^{F26A/Y30A/Y34A}	62
Figura 24 Migración y tubulogénesis de células EA.hy926 estimuladas con histatina-1 ^{F26A/Y30A/Y34A}	64
Figura 25 Mecanismo de acción de histatina-1 en la activación de VEGFR-2.	71

ABREVIACIONES

Hist-1: Histatina-1

VEGF: Del inglés *vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelio-vascular

VEGFR-2: Del inglés *vascular endothelial growth factor receptor type 2*, receptor del factor de crecimiento endotelio vascular tipo 2.

His₆: Cola de 6 histidinas.

WT: Del inglés *wild type*.

Mut: Mutante

PDGF: Del inglés *platelet derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas.

FGF: Del inglés *fibroblast growth factor*, factor de crecimiento de fibroblastos

PTx: toxina pertussis.

I. RESUMEN

HISTATINA-1 PROMUEVE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES MEDIANTE LA UNIÓN Y ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE VEGF TIPO 2

La regeneración de heridas en la cavidad oral es mucho más eficiente que en la piel, y esta característica es debida a distintos factores, siendo uno de los más destacados, la presencia de saliva. Por su parte, se ha demostrado que la saliva tiene actividad en procesos que participan en la regeneración, siendo algunos de los responsables de esta actividad, las histatinas. Las histatinas son péptidos de bajo peso molecular, expresadas en las glándulas salivales, que participan en la protección del esmalte dental y también destacan en su actividad antimicrobiana. Sin embargo, en los últimos años, se ha descrito que uno de estos péptidos, específicamente histatina-1, tiene una alta actividad regenerativa, induciendo la migración celular. Importantly, se ha evidenciado actividad pro-migratoria de este péptido en distintos tipos celulares, en especial sobre células endoteliales, donde histatina-1 no sólo induce la migración celular, sino además favorece procesos como la formación de túbulos *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*. Estos hallazgos han llevado a proponer a histatina-1 como potencial fármaco para nuevas terapias; no obstante, aún no se ha descrito la farmacodinamia de esta molécula. Es por esto, que proponemos a VEGFR-2 como el receptor de histatina-1 en el modelo endotelial. En este trabajo, identificamos a VEGFR-2 como el receptor de histatina-1 en células endoteliales. La inhibición específica y el silenciamiento de la expresión del receptor VEGFR-2 en células endoteliales elimina completamente el efecto pro-migratorio de histatina-1, indicando la participación del receptor en su actividad. Ensayos de *proximity ligation assay* (PLA) en células endoteliales indican un acercamiento espacial entre histatina-1 y VEGFR-2, fortaleciendo la idea de una unión directa entre estas dos moléculas, situación que fue confirmada a través de ensayos de inmunoprecipitación, *pulldown* con proteínas puras y pinzas ópticas. Experimentos de modelamiento y dinámica molecular indican que la interacción entre histatina-1 y VEGFR-2 es similar a la ocurrida entre este receptor y su ligando endógeno, VEGF-A, en donde los residuos F26, Y30 y Y34 de histatina-1 son análogos a los residuos F17, Y21 y Y25 en VEGF-A. Específicamente, estos residuos aromáticos en histatina-1 interactúan con los dominios D2-D3 del receptor, mientras que su mutación triple por alanina, simulada por dinámica molecular, debilita la estabilidad de histatina-1 en el dominio de unión de VEGFR-2, situación que es confirmada en ensayos de *pulldown* con histatina-1 triple mutante. Además, la estimulación de células endoteliales con histatina-1 mutada en estos residuos elimina la actividad de migración y formación de túbulos *in vitro*. En resumen, nuestros hallazgos permiten describir a un receptor endotelial para histatina-1, situación que permitirá tener en conocimiento nuevas aplicaciones y cuidados para los futuros tratamientos en los cuales se vea involucrada este interesante péptido salival.

ABSTRACT

HISTATIN-1 PROMOTES ENDOTHELIAL CELL MIGRATION THROUGH BINDING AND ACTIVATION VEGF RECEPTOR TYPE 2

Wound healing in the oral cavity is much more efficient than in the skin, and this is due to different factors, including the presence of saliva. Saliva has been shown to promote tissue regeneration via molecules that include histatins. Histatins are low molecular weight peptides, expressed in the salivary glands, which participate in enamel protection and that harbor antimicrobial activity. However, in recent years, it has been described that one of these peptides, specifically histatin-1, depicts high regenerative activity, inducing cell migration. Histatin-1, which belongs to the histatin family, is composed of 38 residues and stands out for its high regenerative activity over the other histatins. Importantly, pro-migratory activity of this peptide has been reported in different cell types, namely endothelial cells, where histatin-1 not only induces cell migration, but it also promotes processes, such as tubule formation *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. These findings led to propose histatin-1 as a potential drug for new therapies; however, the pharmacodynamics of this molecule has yet to be described. For this reason, we propose VEGFR-2 as the histatin-1 receptor in the endothelial model. In this work, we identified VEGFR-2 as the histatin-1 receptor in endothelial cells. Inhibition and siRNA-mediated targeting of VEGFR-2 in endothelial cells abrogated histatin-1-dependent cell migration, indicating that this receptor is involved in these responses. Proximity ligation assay (PLA) in endothelial cells showed spatial proximity between histatin-1 and VEGFR-2, further supporting the possibility that these proteins undergo direct binding. This possibility was confirmed by immunoprecipitation, pulldown assays with pure proteins and optical tweezers. Modeling and molecular dynamics experiments indicate that the interaction between histatin-1 and VEGFR-2 is similar to that described for this receptor and its endogenous ligand, VEGF-A, where histatin-1 residues F26, Y30 and Y34 were analogous to residues F17, Y21 and Y25 in VEGF-A. Specifically, these aromatic residues in histatin-1 interacted with the D2-D3 domains of VEGFR-2, whereas their triple alanine mutation, simulated by molecular dynamics, weakened the stability of histatin-1 in the VEGFR-2 binding domain, which was confirmed in pulldown assays with histatin-1 triple mutant. Finally, alanine mutation of these residues abolished migration and tubule formation activity in endothelial cells. In summary, our findings allowed us to describe the endothelial receptor for histatin-1, which will permit developing new applications and approaches to be considered for future treatments involving this peptide.

II. INTRODUCCIÓN

REPARACIÓN DE HERIDAS

La reparación de heridas es un proceso biológico que tiene como objetivo la recuperación de la función y estructura del tejido dañado. Este proceso está gobernado por la regeneración y reparación, que ocurre en cuatro fases parcialmente superpuestas en temporalidad, sea cual sea el tejido: hemostasis, inflamación, proliferación y remodelamiento (Figura I). Cada fase involucra diferentes tipos celulares y moléculas que, de manera altamente coordinadas, llevan a cabo la reparación de la herida (Waasdorp et al., 2021). Para que la reparación tisular ocurra exitosamente, es crítico que estas fases se lleven a cabo en los tiempos apropiados y sin alteraciones, mientras que cuando una de ellas es interrumpida, esto puede derivar en patologías como úlceras o fibrosis (Han & Ceilley, 2017).

FASES DE LA REPARACIÓN DE HERIDAS

La primera fase, conocida como **hemostasis**, comienza en el preciso momento en que ocurre la injuria, y su objetivo es impedir la salida de componentes sanguíneos y la entrada de agentes externos al tejido, en un proceso de síntesis de una capa de fibrina y constricción vascular (Guo & DiPietro, 2010). Por otro lado, y simultáneamente, los restos celulares del tejido dañado, la agregación de plaquetas y la formación de la capa de fibrina inducen la liberación de factores pro-inflamatorios (citoquinas) y factores de crecimiento, como TGF- β (factor de crecimiento tumoral beta), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), que tendrán protagonismo en las fases subsiguientes (Velnar et al., 2009). Posterior al inicio de la hemostasis, se inicia la **fase inflamatoria**, en donde, principalmente, células epiteliales y fibroblastos inician la producción y liberación

de citoquinas y quimioquinas en el lecho de la herida, debido a la presencia de estímulos como DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) y PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos). Estos factores favorecen la iniciación y regulación de la respuesta inflamatoria, favoreciendo la infiltración de células inmunitarias, principalmente monocitos, neutrófilos y macrófagos, donde estos últimos tienen un gran protagonismo, con el objetivo de degradar restos celulares producto de la herida, fagocitar células apoptóticas, además de controlar y eliminar agentes patógenos que hayan podido infiltrarse (Guo & Dipietro, 2010). Luego de que los macrófagos realizan las actividades mencionadas, se da inicio a la resolución de la inflamación, donde los macrófagos conllevan un cambio en el perfil de factores y citoquinas liberadas en el sitio de la herida, permitiendo la predominancia de la **fase proliferativa**. Esta fase se superpone en conjunto con la fase inflamatoria, destacando por el aumento en la tasa proliferativa y migratoria de fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, propiciando las condiciones necesarias para la diferenciación de células mesenquimales y la regeneración del tejido (Waasdorp et al., 2021). Las células endoteliales y fibroblastos destacan en esta etapa, ya que son las que principalmente dan apoyo a la formación de tejido granuloso (Velnar & Gradisnik, 2018). También, esta fase se ve destacada por la síntesis de matriz extracelular, constituida principalmente por colágeno tipo III (que posteriormente será reemplazado por colágeno tipo I), proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Para que estos procesos ocurran, es necesario un incremento en el número de vasos sanguíneos presentes en la herida, y de este modo, es crucial la liberación de factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo que hace de la angiogénesis un proceso vital para la reparación, y en donde las células endoteliales son las encargadas de llevar a cabo esta función (Guo & Dipietro, 2010). Una baja formación de vasos sanguíneos puede derivar en un proceso inflamatorio prolongado, que eventualmente derive en un retraso para la maduración de la matriz extracelular, importante para la fase de

re-epitelialización/remodelamiento (Martin & Nunan, 2015). Una retracción en los capilares formados, seguido de un remodelamiento y contracción en la zona de la herida, en conjunto con la migración y proliferación de células epiteliales, son responsables de la reparación de la barrera epitelial del tejido dañado y es el paso clave en esta fase. La coordinación, tanto de células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y macrófagos, propician el ambiente (presencia de citoquinas y factores de matriz extracelular) para que la reparación de la barrera epitelial finalice con una reparación de herida sana (Dreifke et al., 2015).

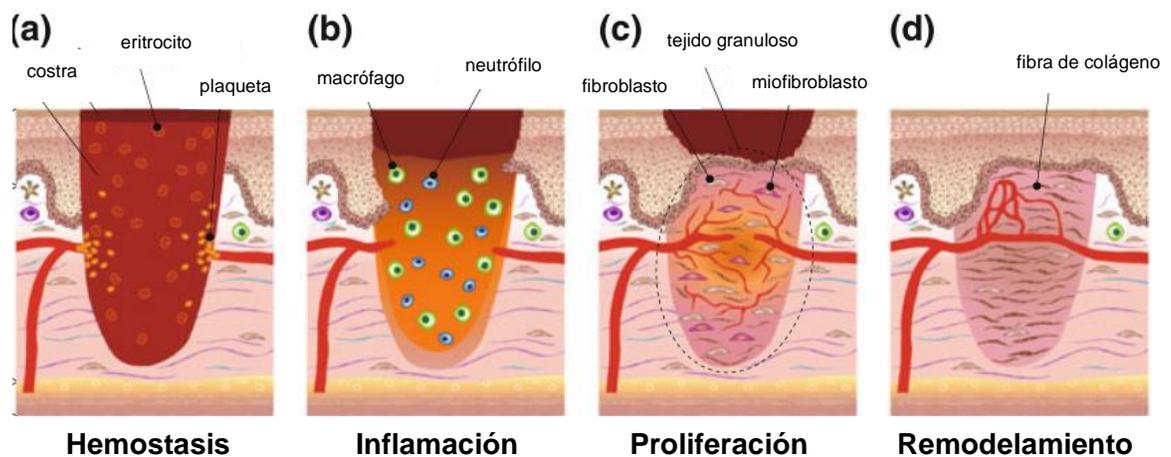


Figura 1. Fases de la reparación de herida. (a) La **hemostasis** es la primera fase. En ella, se produce una vasoconstricción para reducir el flujo sanguíneo y se activa la coagulación para sellar la herida. (b) En la fase de **inflamación**, se produce una respuesta inflamatoria para eliminar las células dañadas y los microorganismos de la zona de la herida. (c) Durante la fase de **proliferación**, se produce la formación de nuevo tejido para reemplazar la zona dañada. (d) En la fase de **remodelación**, el tejido de la herida comienza a madurar y fortalecerse. El colágeno se reorganiza, lo que le da al tejido una mayor resistencia. Figura adaptada de *Kawasumi et al* (2012).

FACTORES QUE AFECTAN LA REPARACIÓN DE HERIDAS.

Como se describió, la reparación de herida es un proceso muy coordinado y complejo, por lo que existen múltiples factores que pueden alterar alguna de sus etapas, llevando a una reparación dañada. Es posible clasificarlos en dos grupos de factores, siendo uno de ellos los factores sistémicos, los cuales involucran la edad, el sexo, nutrición, consumo de drogas (como por ejemplo alcohol y cigarro) y, por otro lado, patologías como la diabetes y la hipertensión

(Guo & DiPietro, 2010; Han & Ceilley, 2017), las que, por lo general, disminuyen la eficiencia de la reparación. También se ha demostrado que factores involucrados en la salud mental, como el estrés, alteran negativamente a la reparación (Gouin & Kiecolt-Glaser, 2011). En general, esto se debe a su impacto en la respuesta del sistema inmune, afectando directamente a la fase inflamatoria de la reparación de heridas, en procesos como la infiltración de células blancas y secreción irregular de citoquinas (Godbout & Glaser, 2006). También, estos factores comparten una disminución en la migración de células epiteliales y endoteliales, lo que también está asociado a una liberación irregular en la matriz extracelular (Godbout & Glaser, 2006). En el caso del sexo y la edad, las hormonas juegan un papel importante, ya que en su mayoría están asociados a procesos genéticos, por lo que la expresión de factores pro-inflamatorios, y secreción de matriz son la principal explicación de la mala reparación (Guo & DiPietro, 2010).

Por otro lado, el segundo grupo de factores asociados a una reparación de herida deficiente son los factores locales, como las infecciones y la oxigenación en la zona de la herida (DiPietro, 2016). En piel o cavidad oral, es frecuente la presencia de microorganismos en heridas de estos tejidos, debido a la existencia de la microbiota. Si la remoción de los microorganismos no ocurre de manera correcta, las bacterias y endotoxinas pueden llevar a una prolongación de la fase inflamatoria, ya que estos aumentan citoquinas pro-inflamatorias como interleuquina-1 y TNF- α (Menke et al., 2007). El proceso de inflamación crónica impide que la reparación de herida sea efectiva, llevando a un aumento de metaloproteasas de matriz, que degradan la matriz extracelular sintetizada en la fase regenerativa, la misma presencia de estas proteasas, disminuye la presencia de factores de crecimiento, necesarios para avanzar en la reparación. (Han & Ceilley, 2017a). Otro factor local es la oxigenación del ambiente, puesto que el oxígeno es un componente primordial para todo tipo de actividad metabólica y, en heridas donde la oxigenación no es la correcta, la reparación se

ve afectada. Específicamente, la hipoxia (disminución en la presión de oxígeno) gatilla la activación de factores como HIF (de la sigla en inglés *hypoxia inducible factor*), que favorecen la migración de células y también el proceso de angiogénesis a través de la inducción de distintos factores como PDGF, TGF- β y VEGF. Sin embargo, cuando el estado de hipoxia es crónico, retrasa la reparación, permitiendo que los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) incrementen, causando daño en el tejido (Castilla et al., 2012).

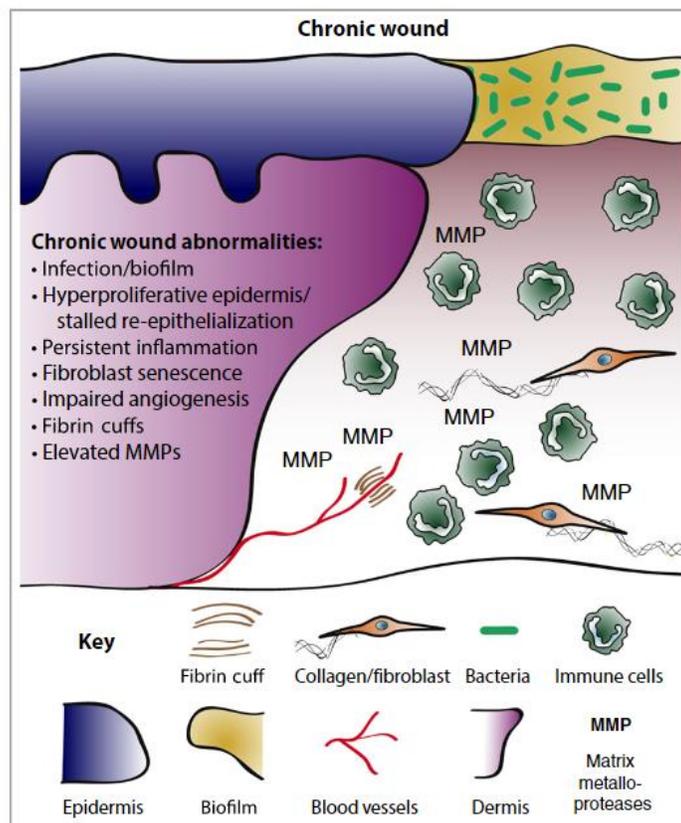


Figura 2. Biología de la herida crónica. Las heridas crónicas pueden incluir la presencia de una epidermis hiperproliferativa, que es un crecimiento excesivo de células en la capa más externa de la piel, y la senescencia de los fibroblastos. Una inflamación persistente puede desarrollarse debido a una angiogénesis desregulada. Y, por último, la liberación de MMPs también contribuye al establecimiento de la herida crónica. Adaptada de *Martin P. et al. (2015)*.

Cualquier tipo de desregulación en las fases de la reparación pueden alterar la buena resolución, derivando en lesiones de fase aguda y que posteriormente, si no son reguladas a tiempo o no se someten a tratamiento, derivan a un estadio crónico. Estas desregulaciones se pueden clasificar principalmente en dos grandes grupos, las ulcerativas (crónicas), y las de generación excesiva de tejido cicatrizante (queloides o hipertróficas). Las úlceras son lesiones a nivel epitelial en donde no ha podido concretarse el cierre total de la herida, son caracterizadas por tener un alto nivel inflamatorio e irrigación excesiva (Pereira & Bártolo, 2016). Por otro lado, las heridas de tejido cicatrizante excesivo generan el estado de fibrosis, el cual es un exceso de tejido conectivo en la herida que ocurre como consecuencia del proceso reparativo, provocando la pérdida de la estructura y función del tejido. Entre ellas, destacan las cicatrices hipertróficas y los queloides, que son caracterizadas por la alta presencia de colágeno y fibrina (Han & Ceilley, 2017).

Como bien se describió, la fase inflamatoria, en conjunto con la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis), son cruciales, y cualquier desregulación en alguna de ellas puede derivar en lesiones, que, para muchas de las cuales, no hay terapia eficaz actualmente. Un factor relevante a nivel celular en estas fases es la **migración**. Sin que ésta ocurra, es imposible la llegada de las células inmunes a la zona de la injuria, o la extensión de vasos sanguíneos para su oxigenación (Li et al., 2013). Por lo tanto, cualquier alteración en la señalización que altere este mecanismo, se verá reflejada en una respuesta mermada de la reparación de herida.

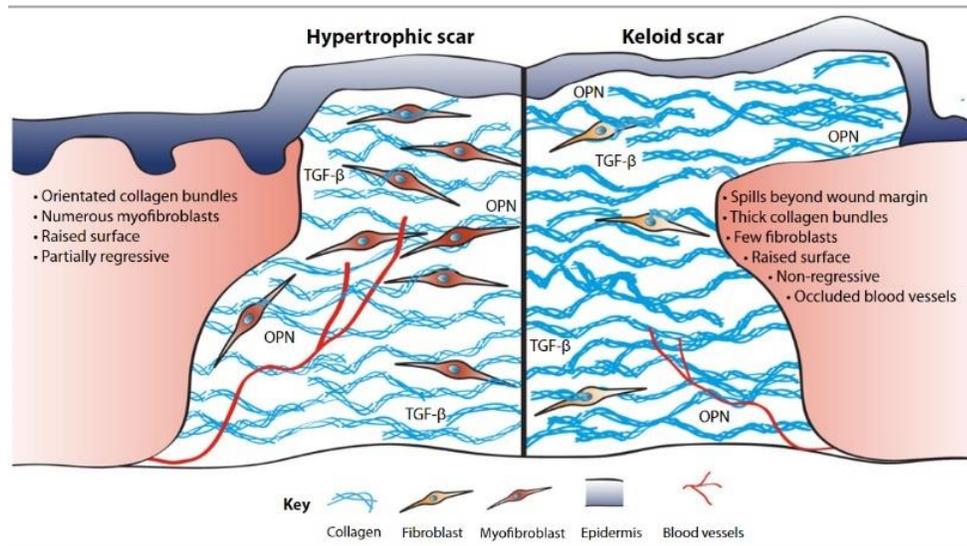


Figura 3. Biología de la fibrosis. En una cicatriz hipertrófica, las células conocidas como fibroblastos producen excesivamente colágeno en el área de la lesión. Además, la producción de otros componentes extracelulares, como las proteínas de la matriz extracelular (ECM), puede verse alterada, lo que contribuye a la formación de una cicatriz anormal. En el caso de una cicatriz queloidal, la producción de colágeno también es excesiva, pero la distribución del colágeno en la piel es diferente a la de la cicatriz hipertrófica. En la cicatriz queloidal, el colágeno se acumula en un patrón desordenado, lo que resulta en una cicatriz gruesa que se extiende más allá del área original de la lesión. Extraída de *Martin P, et al. (2015)*.

MIGRACIÓN CELULAR EN LA REPARACIÓN DE HERIDA.

La migración celular es un proceso altamente complejo, requerido en una gran variedad de eventos fisiológicos, como desarrollo embrionario, la respuesta inmune o en la reparación de tejidos (Waasdorp et al., 2021). Conceptualmente, se ha definido al proceso de migración celular como una secuencia repetitiva de etapas, comenzando con la polarización de la célula, lo que favorece la extensión de protrusiones en la dirección del movimiento de la migración y por otro lado el remodelamiento del citoesqueleto de actina, así como el ensamble y desensamble de adhesiones celulares (Trepatt et al., 2012). En el contexto de la reparación de heridas, el proceso de migración celular está presente en todas las fases. Por ejemplo, en la hemostasis se tiene la constricción vascular, en la fase inflamatoria se observa la llegada de células inmunitarias, mientras que en las fases proliferativa y de remodelamiento, se tiene la llegada de células mesenquimales, además de la propia migración de las células endoteliales,

evento que es fundamental para la formación de nuevos vasos (angiogénesis) y la consecuente restauración en los niveles de oxígeno y nutrientes en la zona de injuria (Waasdorp et al., 2021). El proceso de migración en el contexto endotelial es llevado a cabo por factores liberados en el sitio de la herida por fibroblastos, macrófagos e incluso por las mismas células endoteliales (Li et al., 2013). Uno de los factores más importantes en la inducción de la migración celular endotelial y la angiogénesis es VEGF-A (del inglés *vascular endothelial growth factor A*) (Abhinand et al., 2016), ligando endógeno del receptor clásico de células endoteliales, VEGFR (del inglés *vascular endothelial growth factor receptor*) (Velnar & Gradisnik, 2018). Se ha demostrado que la potencia de la migración de una célula puede tener un componente genético. Evidencias indican como la capacidad migratoria de los queratinocitos orales es mucho más alta que la de queratinocitos en la piel (Turabelidze et al., 2014). Esto hace que la reparación de herida en la cavidad oral sea mucho más eficaz, demostrando la importancia de la migración celular en los distintos contextos y tipos celulares de este tejido.

REPARACION DE HERIDA EN LA CAVIDAD ORAL

La reparación de herida, como se describió anteriormente, es un proceso complejo que requiere de puntos críticos de actividad coordinada para que ocurra eficazmente. Sin embargo, la estructura, organización y genética de cada tejido es distinta, haciendo que los tiempos e intensidad de respuesta a una injuria, sean distintos. Por un lado, en piel, la reparación puede tardar 21 días, e incluso meses en su remodelamiento, mientras que en mucosa oral estos procesos son mucho más rápidos y con una eficaz resolución (Waasdorp et al., 2021). Estas diferencias son atribuibles, en general, a dos factores; por un lado, la propia arquitectura del tejido (o factores intrínsecos), y, por otro lado, el ambiente, determinado por la presencia de microorganismos y la saliva (factores extrínsecos) (Brand et al., 2014).

Respecto a las diferentes fases de la reparación de heridas, en primer lugar, se tiene que para la **hemostasis** no hay evidencia clara que demuestre si hay diferencias directas en los tiempos de cierre o la activación de plaquetas (Waasdorp et al., 2021). En la **fase inflamatoria**, se ha evidenciado que existe una mayor presencia de células blancas residentes alrededor de la herida en la cavidad oral en referencia a la piel, lo anterior debido a una mejor extravasación y la migración de células inflamatorias. Por su parte, en la **fase proliferativa**, procesos importantes como la proliferación y migración de células endoteliales y de fibroblastos ocurre con diferencias importantes, destacando la formación de vasos sanguíneos exacerbada y prolongada en piel, mientras que en mucosa oral esta formación es espaciotemporalmente coordinada (Chen et al., 2010; Waasdorp et al., 2021). De hecho, se ha propuesto que una mayor persistencia en la irrigación de la herida puede conllevar a un período extendido de la inflamación, derivando así en formación de lesiones hipertróficas (Han & Ceilley, 2017).

En cuanto a los factores ambientales, **la presencia de saliva** ha tomado gran protagonismo en los estudios para comprender el ágil proceso de reparación que ocurre en la cavidad oral (Brand et al., 2014; Carpenter, 2013; Lorgulescu, 2009). Este fluido, proveniente de las glándulas salivales, está compuesto en un 99% por agua, mientras que el 1% restante está constituido por otros factores, como citoquinas, factores de crecimiento, y proteínas en general (Lorgulescu, 2009). Este fluido biológico cumple funciones como favorecer la digestión, lubricación de tejidos orales, capacidad tamponante, acción antimicrobiana, mantenimiento de la integridad de la mucosa y limpieza (Carpenter, 2013). Además de estas propiedades, la saliva tiene la capacidad de estimular la migración en distintos tipos celulares, como queratinocitos y células endoteliales, según modelos *in vitro* de células en cultivo (Oudhoff et al., 2008; Torres, Díaz, et al., 2017), favoreciendo la re-epitelialización y angiogénesis en lesiones de la cavidad oral. En la búsqueda e identificación de componentes salivales que dan

cuenta de estos efectos, se determinó que **la presencia de un conjunto de proteínas de bajo peso molecular, conocidas como histatinas, tienen una potente actividad pro-migratoria y reparativa** (Oudhoff et al., 2008), atribuyendo muchas de estas propiedades de la saliva a la presencia de estos péptidos.

HISTATINAS

Las histatinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular, descritos como péptidos ricos en histidinas (Pedro Torres et al., 2017), expresadas únicamente en primates superiores por las células glandulares y liberados en la saliva. Existen más de 12 variantes descritas, dentro de ellas, histatina-1, histatina-3 e histatina-5 son las que en mayor abundancia se encuentran en la saliva (Dijk et al., 2018). Estos péptidos derivan únicamente desde 2 genes conocidos como HTN1 y HTN2 los que expresan histatina-1 e histatina-3, respectivamente. La proteólisis de estos péptidos deriva en las demás variantes, donde histatina-2 deriva de histatina-1, e histatina-5 deriva de histatina-3 (Dijk et al., 2018). Una de las primeras actividades descritas para estos péptidos, fue su capacidad antimicrobiana y antimicótica, además de su actividad protectora del esmalte dental, donde histatina-5 destaca en los efectos mencionados (Torres et al., 2018; Woong Sik Jang, 2011). Por otro lado, histatina-1 e histatina-2 tienen relevancia en el favorecimiento de la migración y adhesión celular (Oudhoff et al., 2008). Histatina-1 e histatina-2 son péptidos responsables de la actividad pro-reparativa de la saliva, así lo indican experimentos *in vitro* donde componentes de la saliva son identificados y analizados en el ensayo de cierre de herida, donde únicamente histatina-1 y 2 favorecen el cierre de herida en células epiteliales, y que este efecto es estéreo-específico (Dijk et al., 2018). Evidencia con ensayos similares, han demostrado que también histatina-1 favorece la migración de queratinocitos orales (Oudhoff

et al., 2008) y de piel (Oudhoff et al., 2009), células óseas (Sun et al., 2020) y células endoteliales (Torres, Díaz, et al., 2017). Debido a su amplio espectro de tipos celulares en los que puede ejercer su efecto, han surgido muchas investigaciones con foco en el desarrollo de histatina-1 como posible terapia para patologías con una reparación de herida desregulada (Torres, et al., 2018). Para ello, **es imprescindible la descripción de la farmacodinamia de esta molécula**; sin embargo, existen pocos estudios referentes a esto. En células epiteliales, se ha reportado que el inhibidor de MEK1/2, U0126 (usado indirectamente para evitar la activación de ERK1/2), fue capaz de inhibir el efecto en el cierre de herida inducido por histatina-2 (derivado de histatina-1), sin embargo, la inhibición de p38 y EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) no mostraron ningún cambio en la actividad (Oudhoff et al., 2008). En queratinocitos de piel humano, también se evidenció que ERK1/2 está involucrado y que el efecto pro-reparativo de histatina-2 está relacionado con un receptor acoplado a proteína G (GPCR), debido al uso de toxina *pertussis* (PTx, inhibidor específico de señalización gatillada por GPCR) (Oudhoff et al., 2009). Por otro lado, en células osteogénicas, p38 y ERK1/2 participan del mecanismo por el cual histatina-1 induce la adhesión celular, pero, a diferencia de como ocurre en queratinocitos, PTx no es capaz de evitar el efecto (Sun et al., 2020). Interesantemente, en células endoteliales, se ha descrito que histatina-1 es capaz de inducir migración y adhesión celular, vinculado a un aumento en la actividad de rab5 (proteína involucrada en la dinámica de endosomas tempranos) y en la fosforilación de ERK 1/2 (Torres, Díaz, et al., 2017). Adicionalmente, histatina-1 es capaz de promover la morfogénesis vascular *in vitro* (también llamado tubulogénesis *in vitro*) y angiogénesis *in vivo* (Cao et al., 2022; Torres, Díaz, et al., 2017). **A pesar de que existe evidencia que intenta describir la vía de señalización por la cual histatina-1 actúa, pareciera ser que ésta difiere, dependiendo del modelo celular al que se estudia, y hasta la fecha no se ha identificado un receptor asociado a células endoteliales.**

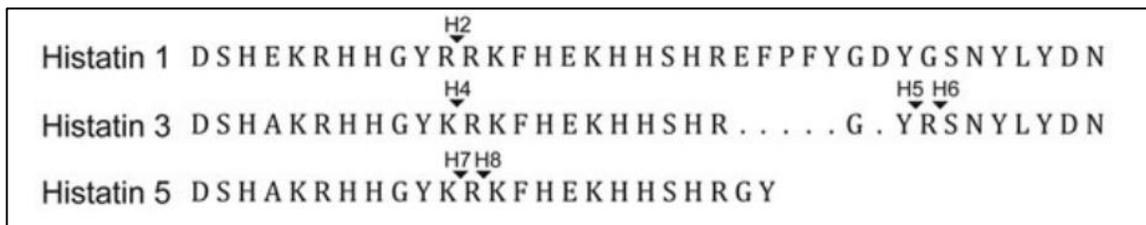


Figura 4. Secuencia aminoacídica de histatinas. Secuencia de histatina-1, -3 y -5 alineadas, indicando el corte proteolítico que da origen a algunas de otras histatinas relevantes (por ejemplo, H2, haciendo referencia a histatina-2) Adaptado de *Woong Sik Jang* (2011)

Referente a los efectos que tiene histatina-1 en células endoteliales, llama la atención la cantidad de estudios que han surgido en modelos *in vivo*, atribuyendo el potencial regenerativo de histatina-1 principalmente a su actividad pro-angiogénica (Castro et al., 2019; Torres, Díaz, et al., 2017; Torres et al., 2018; Zhu et al., 2022). No obstante, es intrigante el hecho de que, **a pesar de que se ha descrito el modo de acción de esta molécula (a nivel de la inducción de la angiogénesis), poco y nada se sabe respecto de su mecanismo de acción en células endoteliales, exceptuando la observación puntual realizada por nuestro grupo, en la cual se sugiere la participación del receptor VEGFR-2 (datos no mostrados en Torres, et al., 2017).**

CÉLULAS ENDOTELIALES Y ANGIOGÉNESIS

Las células endoteliales son las encargadas de dar estructura, forma y función a los vasos sanguíneos, donde son partícipes de la túnica íntima de los vasos, estando en contacto directo con la sangre, formando el endotelio. Actúan como principal regulador del tráfico celular y molecular desde la sangre hasta el interior de los tejidos. En el contexto reparativo, las células endoteliales desempeñan un rol crítico en este proceso y, particularmente, en conjunto con los trombocitos, las células endoteliales participan del proceso de la hemostasis, en la coagulación y la fibrinólisis (Velnar & Gradisnik, 2018). Sin embargo, el

papel protagónico de estas células es en la fase proliferativa, específicamente en el proceso de angiogénesis, dado que el consumo de oxígeno y nutrientes es vital para llevar a cabo esta fase, la cual requiere de uso de un nivel energético considerable para los procesos de reepitelialización y formación de la matriz extracelular (Velnar & Gradisnik, 2018). Sin las células endoteliales, esto no podría ocurrir y, por lo tanto, factores pro-angiogénicos, como FGF, PDGF (*platelet-derived growth factor*), ANG (*angiogenin*) y VEGF son cruciales, puesto que permiten, tanto la proliferación, como la migración de células endoteliales, favoreciendo la formación de nuevos vasos para distribuir los componentes necesarios a las otras células partícipes de la reparación de herida (Abhinand et al., 2016; Tahergorabi & Khazaei, 2012). En este contexto, destaca el papel que cumple el factor angiogénico VEGF-A, dado que es crucial en la inducción de la migración y proliferación en las células endoteliales, donde este factor actúa vía activación de su receptor, VEGFR.

RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y VEGF

VEGF, es una glicoproteína que se encuentra homodimerizada en su naturaleza. Esta proteína tiene 5 isoformas que se diferencian en el largo de su cadena aminoacídica (121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos), que comúnmente son conocidas como VEGF-A (165), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento placentario (PIGF); donde VEGF-A (165) es la isoforma más estudiada en comparación a las otras (Bao et al., 2010). También existen evidencias de la liberación de otros factores homólogos como VEGF-E, que son codificados por virus (Meyer et al., 1999). En el contexto de la reparación de herida, este factor es liberado, tanto por células endoteliales, como por fibroblastos, células musculares, plaquetas, macrófagos y neutrófilos (Abhinand et al., 2016; Bao et al., 2010; Wang et al., 2020). Su receptor, VEGFR, se expresa en células endoteliales, el cual presenta 3 isoformas descritas, VEGFR-1(flt-1),

VEGFR-2(KDR) y VEGFR-3 (Simons et al., 2016). Son receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca, los cuales se encuentran hetero- u homodimerizados, donde la porción extracelular del receptor presenta dominios tipo inmunoglobulina, y su activación gatilla efectos vasculares (VEGFR-1) y pro-angiogénicos (VEGFR-2 y VEGFR-3) (Bao et al., 2010). Cada isoforma de VEGF tiene afinidades distintas para cada receptor (Figura 5). Sin embargo, el principal y más estudiado es VEGFR-2 y su unión a VEGF-A (Abhinand et al., 2016).

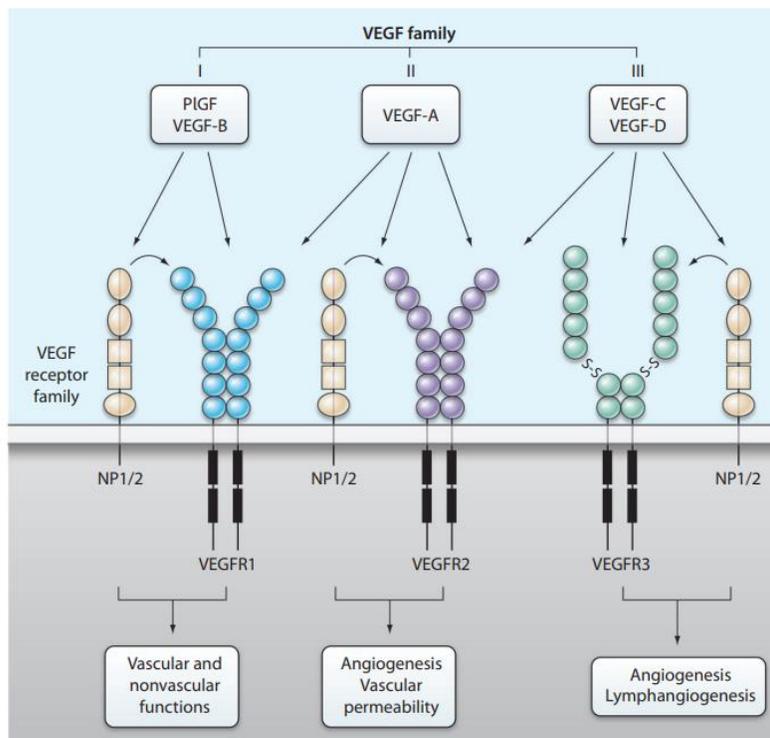


Figura 5. Isoformas de VEGF y VEGFR. Representación del receptor VEGFR, donde se muestran sus tres isoformas y sus co-receptores, neuropilina (NP). Además, se muestran los ligandos endógenos (VEGF) indicando afinidad de cada uno por las diferentes isoformas. Extraída de *Yihai Cao* (2009).

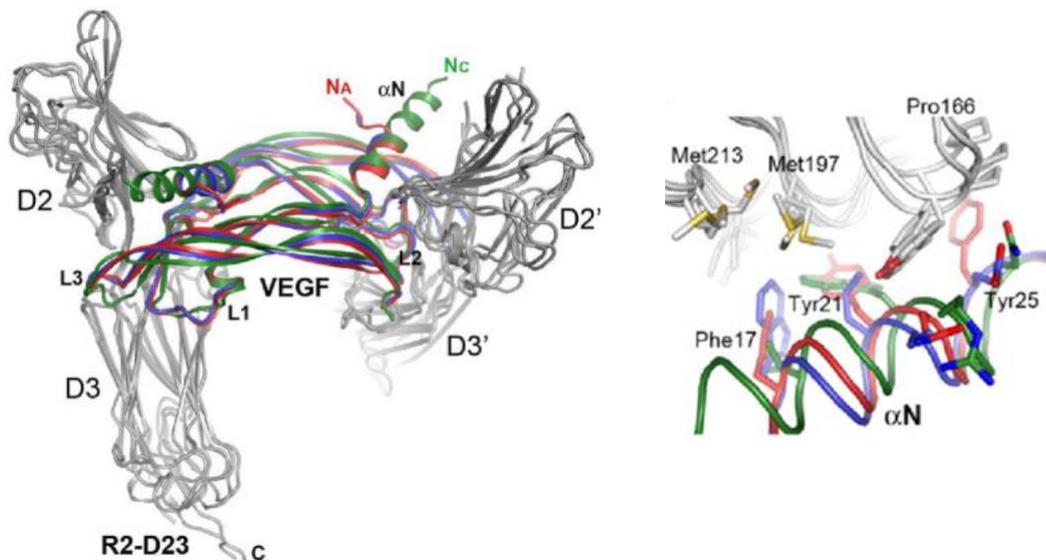


Figura 6. Cristalización e interacción de VEGF-A con VEGFR2. Modelo 3D de la interacción entre VEGF-A (señalado en tri-color rojo-verde-azul) y el dominio D2 de VEGFR-2 (señalado en plomo). Extraída de *Brozzo et al* (2012).

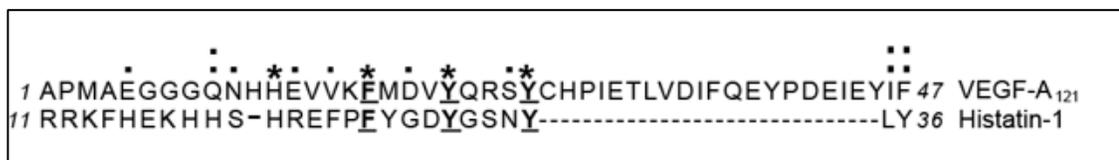


Figura 7. Alineamiento entre histatina-1 y VEGF-A. Por medio de la herramienta BLASTp, se alinearon las secuencias aminoacídicas de Hst1 y VEGF-A. En el recuadro se mencionan los residuos importantes

La estructura de VEGFR-2 consta de un dominio intracelular, donde se encuentra su actividad tirosina quinasa, dominio transmembrana, y el dominio extracelular, formado por 7 dominios tipo inmunoglobulina (Figura 5) (Wang et al., 2020). Evidencia de ensayos de cristalización, describen que VEGF-A se une al receptor VEGFR-2 por medio de los dominios D2-D3 tipo inmunoglobulina (Brozzo et al., 2012) (Figura 6). La interacción entre VEGFR-2 y VEGF-A se encuentra descrita, con datos de cristalización, según Brozzo y cols., indicando que los residuos F17, Y21 y Y25 de VEGF-A interaccionan con los dominios D2-D3 de VEGFR-2 (Brozzo et al., 2012). Esto es relevante debido a que **análisis previos de alineamiento secuencial aminoacídica, indican que histatina-1**

tiene en su secuencia los mismos residuos en una disposición analógica a VEGF-A (Figura 7). La activación por estos residuos en VEGF-A, gatilla el cambio conformacional en el dímero de VEGFR-2, el cual desencadena la fosforilación de residuos tirosina intracelulares, como tirosina 801 [vinculado a la activación por ligando, (Blanes et al., 2007)]. La fosforilación de determinadas tirosinas presentes en el receptor VEGFR-2 gatilla efectos específicos en la célula, como migración o proliferación, y estas señales pueden ser específicamente inducidas, dependiendo de la isoforma VEGF que se una al receptor (Sarabipour et al., 2016). Por ejemplo, se ha asociado la fosforilación de la tirosina 1175 a proliferación, y por otro lado, la fosforilación de la tirosina 1059 y 1214 a migración celular (Abhinand et al., 2016). Por su parte, la cascada de señalización asociada a la activación de VEGFR-2 involucra vías como ERK 1/2 y PI3K/AKT, donde la primera está asociada a proliferación y la segunda a migración (Figura 8) (Dellinger & Brekken, 2011).

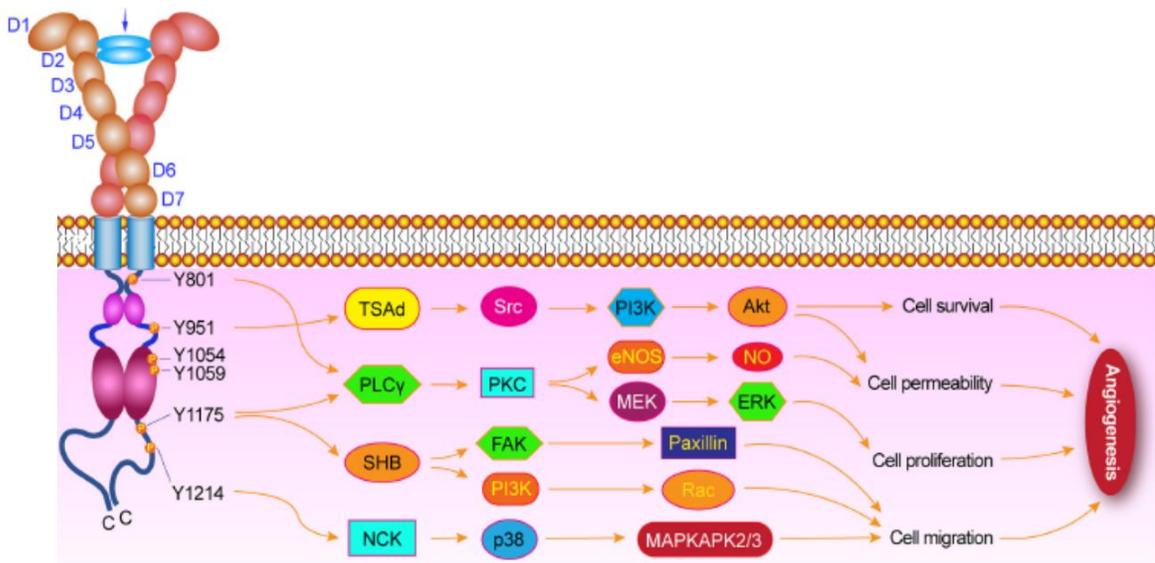


Figura 8. VEGFR-2, estructura y señalización. Figura representativa de la estructura del receptor VEGFR-2, junto con las fosforilaciones descritas asociadas a funciones biológicas favorecidas por la activación del receptor. Extraído de Wang et al (2020).

En conjunto con los antecedentes que la molécula salival histatina-1 es un potente factor pro-angiogénico (Castro et al., 2019; Torres, Díaz, et al., 2017; Zhu et al., 2022) y que este fenómeno parece requerir de la presencia de VEGFR-2 (**datos no mostrados en Torres, Díaz, et al. 2017, y datos preliminares de esta tesis**), surge la posibilidad de que éste sea el receptor que estaría uniendo histatina-1. Ante esta interrogante, se plantea este trabajo de tesis, el cual busca identificar al receptor responsable de la actividad biológica de histatina-1 en células endoteliales.

Resumen de antecedentes

A) Histatina-1 induce la migración celular y angiogénesis, contribuyendo a la reparación de heridas.

B) La migración celular inducida por histatina-1 involucra vías de señalización similares a aquellas gatilladas por la activación de VEGFR-2.

C) Datos preliminares sugieren que la inhibición farmacológica de VEGFR-2 previene la migración celular inducida por histatina-1.

D) El alineamiento entre histatina-1 y VEGF-A indica la presencia de residuos analógicos y que podrían estar implicados en una eventual unión de histatina-1 al receptor VEGFR-2.

III. HIPÓTESIS

“Histatina-1 promueve la migración de células endoteliales mediante la unión y activación del receptor de VEGF tipo 2”.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Determinar si la migración celular inducida por histatina-1 depende del receptor VEGFR-2, uniéndose y activando a este receptor en el modelo celular endotelial EA.hy 926.

IV.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar si la migración celular endotelial inducida por histatina-1 es dependiente de VEGFR-2.
- 2) Evaluar si histatina-1 induce la fosforilación de VEGFR-2 en residuos de tirosina asociados a su activación por unión de ligando y migración, y la consecuente activación de vías de señalización río abajo.
- 3) Determinar si existe unión entre histatina-1 y VEGFR-2.
- 4) Evaluar la relevancia de los residuos F26, Y30 y Y34 de histatina-1 en la unión a VEGFR-2 y la migración celular endotelial.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Histatina-1

Histatina-1 fue obtenida por síntesis química (Biomatik, Wilmington, DE, USA). La secuencia aminoacídica DpSHEKRHHGYRRKFHEKHSHREFPFYGDYGSNYLYDN corresponde a histatina-1 *wild type*, la que se encuentra fosforilada en el dominio serina 2. La secuencia SYGYKNpSPLYNHDRFEDKYGHFEDHFSRRHKREYGGH corresponde al péptido *scramble* diseñado a partir de los residuos de histatina-1. La secuencia DSHEKRHHGYRRKFHEKHSHREFPAYGDAGSNALYDN corresponde a la estructura de histatina-1 mutada en los residuos F26, Y30 y Y34 (histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A}). Los péptidos fueron sintetizados también con una cola poli-histidina (his₆). Estas últimas, fueron sintetizadas químicamente en colaboración con el laboratorio del Dr. Floris J. Bikker (Universidad de Amsterdam).

V.2. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular endotelial humana EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™), células endoteliales primarias de vena de cordón umbilical humano (HUVEC, sigla del inglés *human umbilical cord vein endothelial cells*), y queratinocitos orales humanos inmortalizados (OKF6/Tert2). Las células EA.hy926 y HUVEC se cultivaron en medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% v/v y penicilina/estreptomicina en incubadora a 37°C con 5% de CO₂. Las células HUVEC requirieron de una pre-incubación en la placa de 24 pocillos con gelatina al 5% v/v en PBS. Las células OKF6/Tert2 se cultivaron con medio de queratinocito libre de suero suplementado con extracto pituitaria bovina y rhEGF (17005042; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US). Para la suspensión de células y posterior utilización, se realizó una tripsinización durante 30 segundos aproximadamente por placa. Luego de la suspensión, el volumen obtenido es

centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos, el pellet obtenido es re-suspendido en el medio (acorde al ensayo) y son plaqueadas para la necesidad especificada en cada ensayo, tanto para transwell, como para extracción de proteínas.

V.3. Ensayo de migración en cámara de Boyden o Transwell.

Para determinar la migración celular, se incubaron 50.000 células por cámara (6,5 mm de diámetro 8µm de tamaño de poro, Transwell Costar), que previamente fueron pre-cubiertas 24 horas antes con fibronectina 2 µg/mL a 4°C. Cada cámara fue colocada en placas de 24 pocillos con medio DMEM sin suplemento de suero (550 µL al fondo del pocillo y 100 µL al interior de la cámara). Una vez realizado el ensayo, se fijaron las células con una solución de cristal violeta durante 60 minutos, posterior a ello, se procedió a cuantificar por conteo de campo en microscopio la cantidad de células presentes en la membrana de la cámara.

- A) Ensayo de inhibidor ZM323881 y silenciamiento de VEGFR-2: histatina-1 10 µM y VEGF-A 40 ng/mL (Cat PHC9394, Thermo Fisher Scientific) se incubaron durante 90 minutos a 37°C. La incubación del inhibidor específico contra VEGFR-2, ZM323881 1 µM (Cat SML1691-5MG, Sigma Aldrich, Burlington, MA, US), fue de 5 minutos previamente para cada condición.
- B) Ensayo histatina-1 y variantes: histatina-1, his₆-histatina-1 e histatina-1 mutante 10 µM se incubaron durante 90 minutos a 37°C.

V.4. Silenciamiento de VEGFR-2

Con el fin de silenciar el receptor VEGFR-2, se utilizó la herramienta de siRNA, siVEGFR-2 (sc-29318, Santa Cruz Biotechnologies) y siControl (sc-37007, Santa Cruz Biotechnologies). Se sembraron 200.000 células EA.hy926 por pocillo en una placa de 6 pocillos. Luego de 24 horas, se incubaron las células con sus respectivos siControl y siVEGFR-2, preparados en una solución final con

OPTIMEM y iMAX (Lipofectamine™ RNAiMAX Invitrogen™, Thermo Fisher, Cat 13778030), durante 24 horas más. Posteriormente, se lavaron las células retirando el medio e incubando nuevamente con DMEM suplementado 10% SFB durante 24 horas. Pasado este proceso, se utilizaron las células para ensayo de transwell y extracción de proteínas.

V.5. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se obtuvo desde un homogenizado de células correspondiente a cada experimento, utilizando amortiguador de lisis (HEPES 25 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, NP-40 1%, glicerol 10% y el cóctel de inhibidores ditioneitol, ortovanadato de sodio, fluoruro de fenilmetilsulfonilo y fluoruro de sodio). Una vez obtenido el volumen de proteínas en el buffer, este se homogenizó sonicando la muestra para luego centrifugar a 13.000 rpm durante 8 minutos a 4°C. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas de cada extracción y se les añadió buffer de carga denaturante y se calentaron las muestras por 8 min a 90°C.

V.6. Western Blot

Para analizar los ensayos de inmunoprecipitación, pulldown y extractos de proteínas, las muestras obtenidas se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones denaturantes (SDS). Posteriormente las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, bloqueadas con gelatina 5% v/v en 0,1% v/v Tween/TBS durante 2 horas a 4°C. Luego se incubó durante toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios específicos correspondientes a cada experimento. Los anticuerpos usados en este trabajo corresponden a VEGFR-2 (Cat 2479, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, US), fosfo-Y801-VEGFR-2 (Cat VP2921, ECM Biosciences, Versailles, KY, US), His6-tag (Cat Ab5000, Abcam, Cambridge, UK), histatina-1 (Cat ab70024, Abcam; Cat sc-98945, Santa Cruz Biotechnology), integrina β 1 (Cat sc-8978,

Santa Cruz Biotechnology) y PDGFR α (Cat ab124392, Abcam). Una vez incubadas las membranas con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados con 0,1% v/v Tween/TBS de 5 minutos cada uno, y luego las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP, con la finalidad de ser revelados por el sistema EZ-ECL y visualizados en el fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

V.7. Inmunoprecipitación

Beads de sefarosa acopladas con proteína A se incubaron con 10 μ g de anticuerpo anti-His₆ durante 1 hora a 4°C para ser inmovilizados. Posteriormente se realizó una incubación con solución de bloqueo (5% albúmina de suero bovino, BSA, en PBS) durante 1 hora a 4°C, para luego incubar las beads cargadas y bloqueadas con 50 μ g his₆-histatina-1 (en solución 20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,4) por 1 hora a 4°C. Las beads cargadas con his₆-histatina-1 se incubaron con un extracto de proteínas EA.hy926 (500-1000 μ g) en rotador a temperatura ambiente por 30 minutos. Los experimentos se analizaron por Western blot, como se describió anteriormente.

V.8. Pulldown

Pulldowns con Fc-VEGFR-2 recombinante. Se utilizaron beads de sefarosa conjugadas con proteína A, que fueron lavadas con 500 μ L de PBS frío y luego centrifugadas a 800 x g durante 30 segundos a 4°C. Posteriormente, se resuspendieron en 500 μ L de la solución amortiguador de unión (100mM NaCl; 50mM Tris pH 7.4). Luego, 1 μ g de Fc-VEGFR-2 recombinante (dominio extracelular correspondiente a los residuos 1–764; VEGFR2-Fc; LS-G47161-50, LSBio, Seattle, USA) se incubaron durante 2 horas a 4°C, junto a las beads. Luego, las muestras se centrifugaron a 800 x g por 30 segundos a 4°C, para ser lavadas con 500 μ L de amortiguador de unión y luego centrifugadas nuevamente. Además, fue necesario realizar una incubación con solución de bloqueo

(amortiguador de unión con 2% de BSA) durante 1 hora en rotación a 4°C. Posteriormente se repitió el lavado con amortiguador de unión para luego ser incubadas por 2 horas con 10 µM de histatina-1, his₆-histatina-1 o *scramble* en rotación a 4°C. Terminada la incubación, las muestras se centrifugaron y lavaron como se describió previamente, y se solubilizaron en amortiguador Laemmli para ser analizadas por Western blot.

Ensayo de binding con beads Ni-NTA **[Colaboración con Dr. Marcelo Rodríguez]**. A diferencia del pulldown anterior, se utilizaron esferas de níquel cargadas con his₆-histatina-1, e incubadas con Fc-VEGFR-2 soluble. Las beads de agarosa níquel-NTA se incubaron en presencia o en ausencia de his₆-histatina-1 durante 30 minutos. Se realizaron lavados con amortiguador de unión y centrifugaciones, como se describió en el punto anterior. Luego, las beads se incubaron con 1 µM de Fc-VEGFR-2 en amortiguador de unión, por 1 hora. Luego se realizaron nuevamente lavados con amortiguador de unión. Las beads se rescataron y trataron con amortiguador de unión-imidazol (25 mM imidazole, 100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4) y analizadas por rojo Ponceau y Western blot (Mateluna et al., 2022).

V.9. Inmunofluorescencia [Colaboración Dr. Patricio Silva]

Para estos ensayos, posteriormente al tratamiento respectivo, células EA.hy926 fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído 4% (15 minutos, temperatura ambiente) y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1%. Posteriormente, las células fueron bloqueadas en BSA al 2% y fueron incubadas con anticuerpos primarios contra los blancos mencionados en resultados (Figura 6) a 4°C toda la noche. Luego, se incubaron los anticuerpos secundarios respectivos para cada especie de cada anticuerpo primario, cada uno de ellos conjugados con un marcador fluorescente (Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 568, Thermo Fisher Scientific) por 1 hora, a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con 10 µg/mL Hoechst 33,342 (Cat H3570, Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, las imágenes se obtuvieron utilizando microscopía confocal (NIKON C2Plus) y analizaron usando el software ImageJ (Rasband, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; JACOP plugin usado para obtener mediciones del coeficiente de Manders).

V.10. Ensayo de ligación por proximidad (PLA) [Colaboración Dr. Patricio Silva]

Las células EA.hy926 se lavaron con PBS y fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente a su estimulación con o sin His₆-histatina-1 a 10 µM a 37°C durante 5 minutos. El procesamiento de la muestra se realizó como lo indica el protocolo del proveedor de Duolink® (Cat DUO92101, Sigma-Aldrich). Se realizó la incubación de anticuerpos primarios contra His6-tag y fosfo-Y801-VEGFR-2 a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizó la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con una sonda de nucleótidos, que, al estar cercanos a una distancia no mayor a 40 nm, permiten detectar fluorescencia a través de la reacción en cadena de la polimerasa producida por la hibridación de los nucleótidos de ambos anticuerpos secundarios. El núcleo se tiñó con DAPI, incluido en el kit Duolink®. Las imágenes se obtuvieron usando el microscopio confocal Nikon C2Plus (Tokio, Japón), y las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software ImageJ (Rasband, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

V.11. Pinzas Ópticas [Colaboración Dr. Christian Wilson]

Con la finalidad de estudiar la ruptura mecánica de la interacción entre VEGFR-2 e histatina-1, se utilizó el equipo miniTweezers (con adaptaciones indicadas en Mateluna et al., 2022; Peña-Oyarzun et al., 2021). Con este fin, se prepararon beads cubiertas con proteína G de tamaños diferentes, una de 2,5 µm (cargada con VEGFR-2-Fc) y la otra de 3,1 µm (cargada con anticuerpo anti His₆-tag, con la finalidad de inmovilizar his₆-histatina-1). La bead cargada con VEGFR-2, fue

capturada con la trampa óptica, mientras que la cargada con His₆-histatina-1 fue capturada con la micropipeta de la microcámara por succión. De esta forma, se realizaron ciclos de acercamiento y retracción a 100 nm/s. La unión entre estas dos proteínas se analizó luego de tener un acercamiento entre las 2 beads, permitiendo la interacción en alrededor de 1 s. Una vez concretado este paso, se realizaron movimientos en la dirección opuesta de la bead capturada por la trampa óptica, a una fuerza constante de 0,1 pN/s de retracción. Como control negativo, se utilizó una bead de 3,1 µm sin carga de histatina-1. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente controlada de 24°C usando amortiguador de unión (50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl).

V.12. Modelamiento molecular [Colaboración Dr. Gerald Zapata, Douglas Matthies]

Para modelar la estructura tridimensional de histatina-1 se utilizó el servidor web de *Robetta* (Kim et al., 2004), lo que permitió utilizar el N-terminal de la α-hélice de la estructura cristalizada de VEGF-A como molde (id en PDB: 3V2A). Residuos inconclusos de la estructura del cristal de VEGFR-2 se completaron utilizando el servidor *SWISS-MODEL*.

V.13. Docking molecular [Colaboración Dr. Gerald Zapata, Douglas Matthies]

Para determinar la conformación en la cual histatina-1 podría estar uniéndose a VEGFR-2 y determinar interacciones, se realizaron estudios de docking molecular mediante el servidor de Rosetta FlexPepDock (London et al., 2011). Se obtuvieron 300 modelos de baja y alta resolución para cada péptido (histatina-1 e histatina-1 mutada), de las cuales fueron seleccionados únicamente las conformaciones con mejor puntaje de selección acorde a su energía libre.

V.14. Dinámica molecular [Colaboración Dr. Gerald Zapata, Douglas Matthies]

Los complejos seleccionados de los datos obtenidos por docking molecular, se sometieron a 303 °K, usando la suite de AMBER (<https://hdl.handle.net/10993/16614>). El sistema se construyó usando el servidor *Charmm-Gui*, y la dinámica corresponde a un total de 40 ns por experimento (Mateluna et al., 2022).

V.15. Análisis estadístico

Según la pertinencia del experimento, los resultados se analizaron, posteriormente a haber sido sometidos a test de normalidad. Acuerdo con el análisis, se realizaron test de t no paramétrico (Mann-Whitney) o ANOVA de una vía (Kruskal-Wallis, no paramétrico). Se compararon valores promediados de al menos tres experimentos independientes. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

VI. RESULTADOS

VI.1. Objetivo específico 1

DETERMINAR SI LA MIGRACIÓN CELULAR ENDOTELIAL INDUCIDA POR HISTATINA-1 ES DEPENDIENTE DE VEGFR-2.

VI.1.1. Inhibición farmacológica de VEGFR2.

Para determinar la dependencia del receptor VEGFR-2 en el efecto pro-migratorio inducido por histatina-1 en células endoteliales, se planteó determinar la migración de la línea celular endotelial EA.hy926, estimulada con histatina-1, ya sea en presencia o ausencia del inhibidor específico contra VEGFR-2, ZM323881 (Whittles et al., 2002). Para ello, se realizó el ensayo de cámara de Boyden, el cual nos permitió determinar la migración de estas células enfrentadas a las condiciones mencionadas. Los resultados indican que histatina-1, en concentración fisiológicamente presente (10 μ M, Menno J Oudhoff et al., 2008) induce la migración de células endoteliales, confirmando lo anteriormente demostrado por nuestro grupo de laboratorio (Torres, Díaz, et al., 2017). Sin embargo, este efecto se pierde cuando se realiza una incubación en presencia del inhibidor específico ZM323881, no así con la condición vehículo sólo (DMSO). Importantemente, el inhibidor ZM323881 fue también capaz de eliminar el efecto pro-migratorio de VEGF-A, ligando endógeno de VEGFR-2, y válido como control positivo (Figura 9).

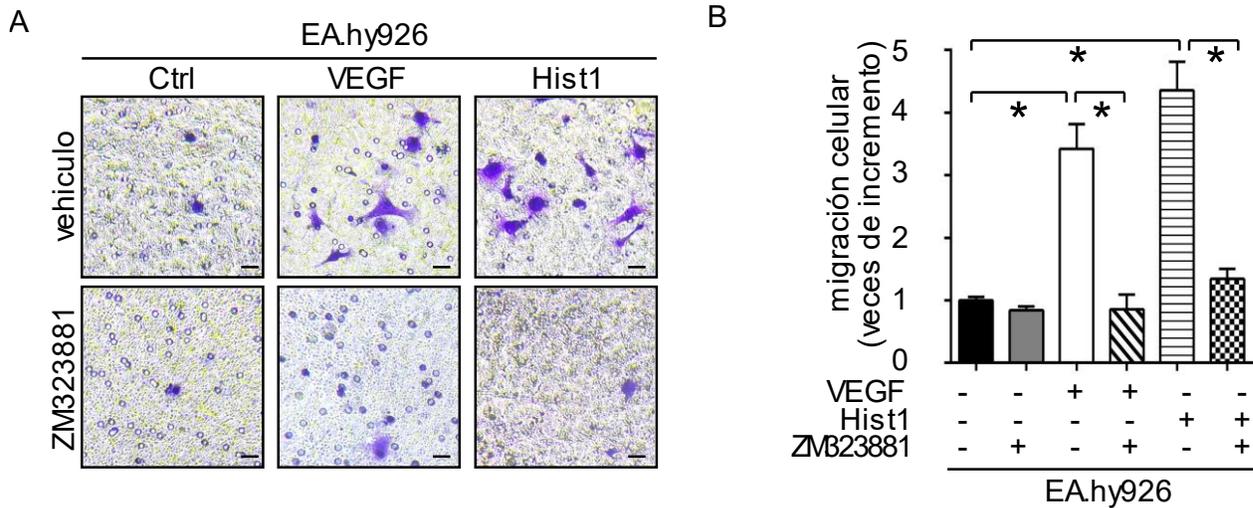


Figura 9. Efecto del inhibidor específico de VEGFR-2, ZM323881, en la migración celular endotelial inducida por histatina-1. Ensayo de transwell utilizado para determinar la migración celular endotelial inducida por histatina-1 en presencia del inhibidor específico ZM323881. (A) Imágenes representativas para cada condición evaluada en el ensayo. El número promedio de conteo de células para cada condición fue: para control (Ctrl = 3), ZM323881 (3), VEGF-A (14), VEGF-A + ZM323881 (5), histatina-1 (16), histatina-1 + ZM323881 (4) (B) Representación gráfica de A, correspondiente a la migración de células EA.hy926, donde se determinaron las condiciones control (DMSO sólo, línea segmentada), inhibidor 1 μ M (ZM323881), control positivo VEGF-A 40 ng/mL, VEGF-A en presencia de inhibidor (VEGF + ZM323881), histatina-1 10 μ M (Hist1) e histatina-1 en presencia del inhibidor (Hist1 + ZM323881). Los datos corresponden a la cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar, * $p < 0,05$).

VI.1.2. Silenciamiento de VEGFR-2 en células endoteliales.

Aun cuando se ha descrito que el inhibidor ZM323881 es específico para VEGFR-2 a la concentración utilizada en este trabajo (Whittles et al., 2002), no podemos descartar la existencia de efectos no deseados en nuestro modelo. Por esta razón se planteó realizar el silenciamiento de VEGFR-2 endógeno en el modelo de células endoteliales, con la finalidad de complementar la observación de que VEGFR-2 es el responsable de la actividad pro-migratoria de histatina-1. Para ello, las células EA.hy926 se silenciaron para el receptor VEGFR-2, por medio de la herramienta de siRNA (mezcla de 3 secuencias de siRNA comerciales contra VEGFR-2 humano), para luego ser sometidas al ensayo de migración celular en presencia de histatina-1. En primer lugar, se ajustaron las condiciones para un silenciamiento óptimo. Se realizaron incubaciones a distintas concentraciones de siRNA (50, 100 y 200 nM) durante 24 horas en medio DMEM sin suero y

posteriormente se obtuvieron extractos para analizar los niveles residuales de VEGFR-2 mediante Western blot. De esta forma, se determinó que la concentración de siRNA a 50nM fue suficiente para evidenciar una disminución significativa en el nivel de VEGFR-2 (Figura 10). Sin embargo, para los ensayos posteriores se decidió utilizar la concentración de 100 nM, de manera de evitar trabajar en condiciones límites, puesto que la eficiencia de silenciamiento podría variar de experimento en experimento.

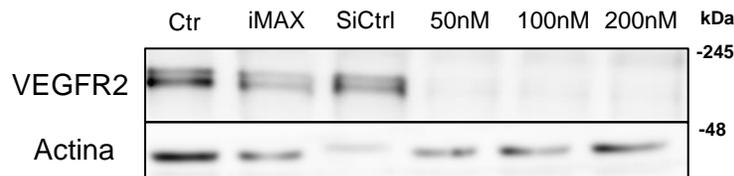


Figura 10. Estandarización de siRNA en células EA.hy926 para el silenciamiento de VEGFR-2. Western blot de VEGFR-2 y Actina de un extracto de células EA.hy926 tratadas con siRNA-VEGFR-2 a distintas concentraciones (50 nM, 100 nM y 200 nM), utilizando siCtrl a 200 nM como control. iMAX corresponde a lipofectamina, como se indica en métodos (vehículo).

Una vez determinada la concentración de siRNA con la cual trabajar, las células EA.hy926 se transfectaron por 24 horas con la mezcla de siRNA (control o VEGFR-2) y posteriormente se usaron en el ensayo de migración celular por Transwell, con el fin de determinar si la disminución en la expresión de VEGFR-2 afectaba la migración celular inducida por histatina-1. Tanto en la condición sin transfección (NT) como en la transfección con siRNA control (si-Ctrl), fue posible evidenciar el efecto pro-migratorio de histatina-1 y VEGF-A (este último como control positivo) (Figura 11). Sin embargo, se observó que el silenciamiento de VEGFR-2 disminuyó drásticamente la migración celular inducida, tanto por histatina-1, como por VEGF-A (Figura 11). Estos resultados indican que la expresión de VEGFR-2 es requerida para la migración celular inducida por histatina-1.

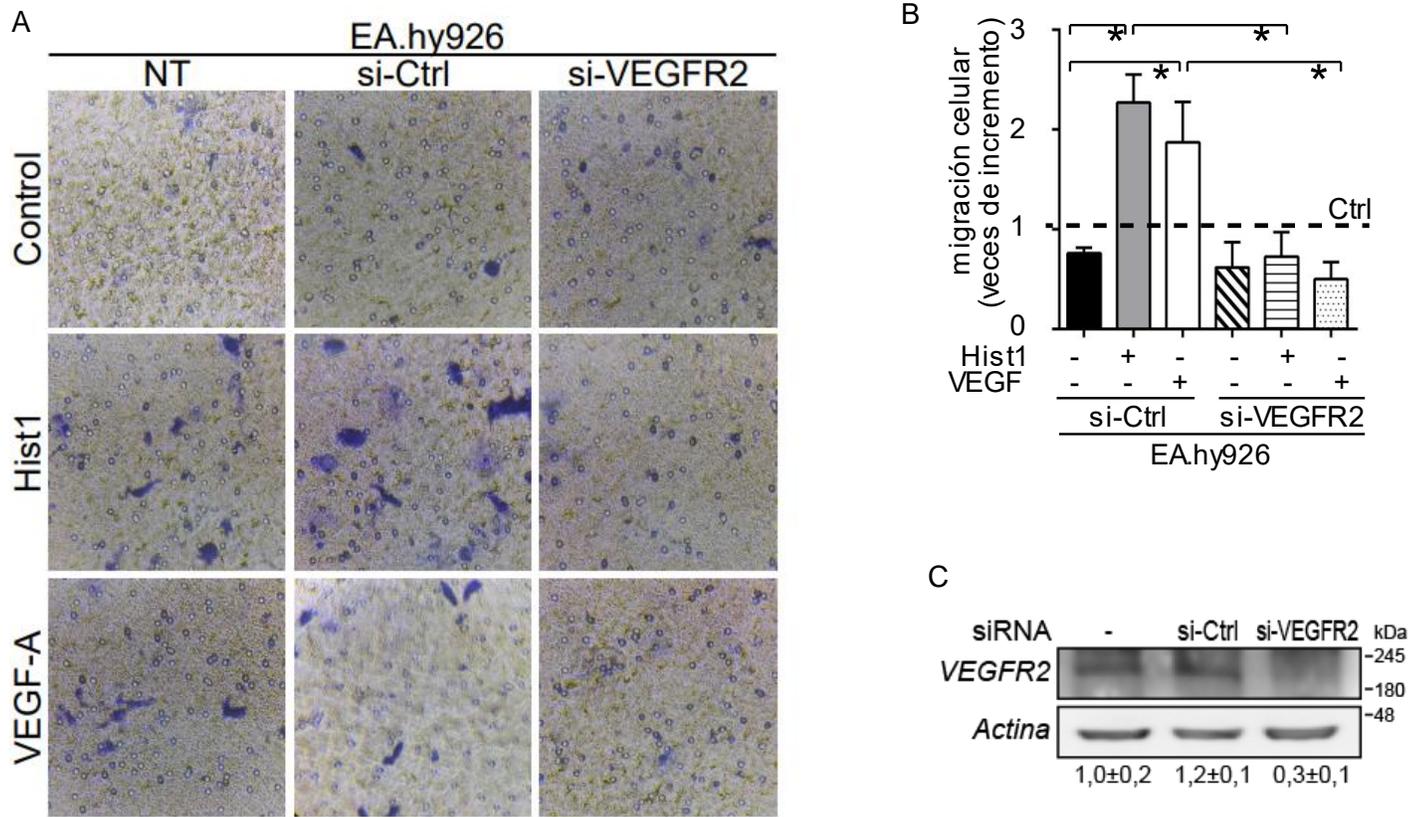


Figura 11. Efecto de histatina-1 en células endoteliales silenciadas con siRNA contra VEGFR-2. (A) Imágenes representativas de transwell para la migración inducida por histatina-1 (Hist1, 10 μ M) en condiciones no tratada (NT), siRNA-control (si-Ctrl) y siRNA-VEGFR2 (si-VEGFR-2), utilizando VEGF-A (40 ng/mL) como control positivo. En promedio, el número de células contadas por campo para cada condición fue: siCtrl (NT = 4; Hist1 = 13; VEGF-A = 12), y si-VEGFR-2 (NT = 5; Hist1 = 6; VEGF-A = 4). (B) Cuantificación de la migración celular inducida por histatina-1 en las condiciones presentadas en panel A. Los datos son presentados en relación a la migración celular normalizada, observada en condición basal (sin estímulo con histatina-1, sin transfección; línea segmentada con valor 1). (C) Cuantificación por Western blot de VEGFR-2 en células EA.hy926 incubadas con 50 nM de siRNA indicado en el panel. Los datos corresponden a la cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar, * $p < 0,05$).

VI.1.3. Inhibición de VEGFR-2 en distintos tipos celulares.

Existe evidencia de que histatina-1 induce la migración celular, no tan sólo en nuestro modelo propuesto (células endoteliales), sino además en otros tipos celulares, como queratinocitos y fibroblastos de distinto origen (Oudhoff et al., 2008, 2009). Por otro lado, las células EA.hy926 son una línea celular, por lo que también nos cuestionamos si es que la participación de VEGFR-2 es generalizada en células endoteliales o sólo algo restringido a este modelo en particular. Debido a estas interrogantes, nos planteamos responder si es que VEGFR-2 participa en la vía de activación de histatina-1 en células endoteliales de cultivo primario, HUVEC, y también en la línea celular de queratinocitos orales OKF6/Tert2. Con este propósito, evaluamos el efecto de histatina-1 y del inhibidor ZM323881 en la migración de células HUVEC y OKF6/Tert2. Importantemente, previo a este ensayo, se evaluó la expresión de VEGFR-2 en ambos modelos celulares mediante Western Blot, observando niveles detectables de la proteína en células EA.hy926 y HUVEC. Sin embargo, en células OKF6/Tert2, ésta es casi indetectable (Figura 12). Una vez confirmada la expresión de VEGFR-2, se determinó la migración celular en cada uno de los modelos celulares, observando que histatina-1 induce migración celular, tanto en HUVEC como en OKF6/Tert2. Sin embargo, la inhibición de VEGFR-2 solamente afectó la migración estimulada en las células HUVEC, pero no en OKF6/Tert2 (Figura 12). Este hallazgo confirma que la actividad pro-migratoria de histatina-1 es inducida a través del receptor VEGFR-2 en diferentes modelos endoteliales, y que este fenómeno es exclusivo de este tipo celular.

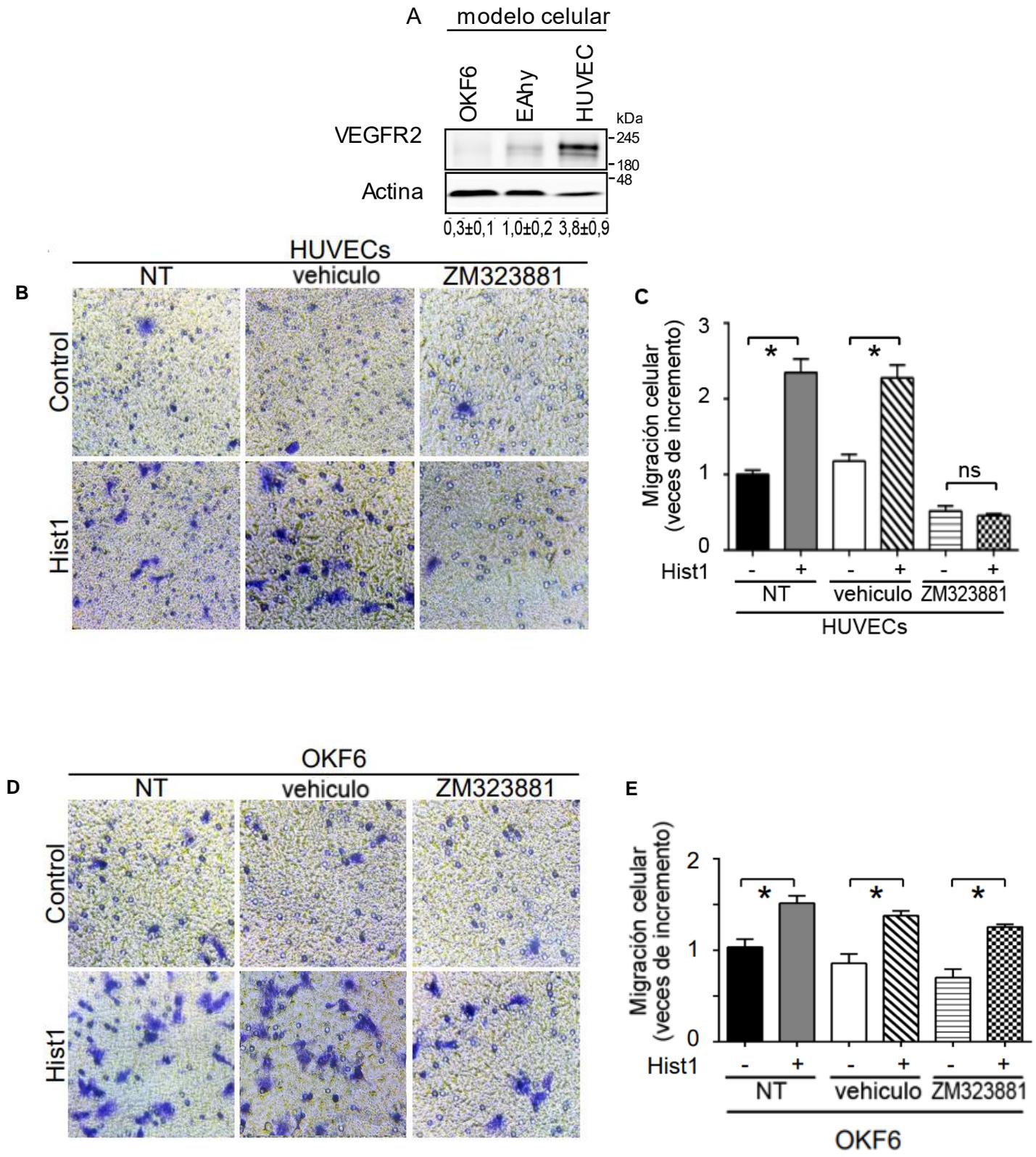


Figura 12. Efecto de histatina-1 en la migración de HUVEC y OKF6. (A) Western blot de VEGFR-2 en distintos modelos celulares (OKF6, EA.hy926 y HUVEC) normalizado respecto de actina. (B) Imagen representativa de migración celular en transwell de HUVEC estimuladas con histatina-1 (Hist1) en presencia y ausencia de inhibidor ZM323881 utilizando como vehículo (DMSO). El número promedio de conteo de células para cada condición fue: DMSO (- Hist1 = 15; + Hist1 = 31), y ZM323881 (- Hist1 = 6; + Hist1 = 6). (C) Cuantificación de ensayo de transwell en células HUVEC mostradas en panel B. (D) Imagen representativa de migración celular de células OKF6 en mismas condiciones descritas en (B). El número promedio de conteo de células para cada condición fue: DMSO (- Hist1 = 34; + Hist1 = 54), y ZM323881 (- Hist1 = 30; + Hist1 = 50). (E) Cuantificación de ensayo de transwell de células OKF6 mostradas en panel D. Los datos corresponden a la cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar, * $p < 0,05$).

VI.2. Objetivo específico 2

EVALUAR SI HISTATINA-1 INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE VEGFR-2 EN RESIDUOS DE TIROSINA ASOCIADOS A SU ACTIVACIÓN POR UNIÓN DE LIGANDO Y MIGRACIÓN, Y LA CONSECUENTE ACTIVACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RÍO ABAJO.

VI.2.1. Fosforilación de tirosina 801 (Y801) en el receptor VEGFR-2

Anteriormente describimos la dependencia de VEGFR-2 en el efecto de histatina-1 en células endoteliales, por lo tanto, la siguiente pregunta fue determinar si existe activación de este receptor, ya sea directa o indirecta. La estrategia que adoptamos para determinar una activación directa fue buscar un marcador de este tipo de activación, para nuestro caso, existe una fosforilación específica en tirosina 801 (Y801), la cual se ha evidenciado que es fosforilada solamente cuando ocurre la dimerización gatillada por la unión del ligando con el receptor (Brozzo et al., 2012). De esta forma, planteamos determinar la fosforilación de VEGFR-2 en Y801, mediante Western blot en extractos de células EA.hy926. Además, fue necesario determinar la cinética de esta fosforilación, debido a que se ha evidenciado que el máximo inducido por el ligando VEGF-A (*peak* de activación) ocurre no más allá de los 5 minutos post-estímulo (Blanes et al., 2007). Los resultados muestran que el estímulo de células EA.hy926 con histatina-1 induce una fosforilación del receptor VEGFR-2 en Y801, específicamente al minuto 2 post-estímulo (Figura 13), en un tiempo comparable al descrito con VEGF-A (Blanes et al., 2007).

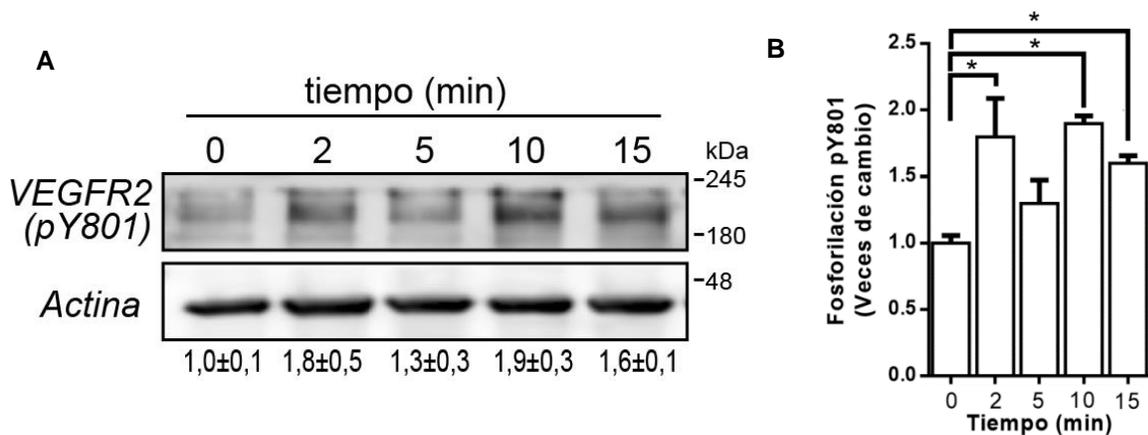


Figura 13. Fosforilación de VEGFR-2 en el residuo Y801 inducido por histatina-1. (A) Western blot de cinética de fosforilación de pVEGFR-2 en residuo Y801 y actina, en extractos de proteínas de células EA.hy926 estimuladas a distintos tiempos de tratamiento con histatina-1 a 10 μ M (0, 2, 5, 10 y 15 minutos). (B) Cuantificación de los datos presentados en panel (A). Los datos corresponden a la cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar, * $p < 0,05$).

VI.2.2 Fosforilación de ERK 1/2 y p38 en células endoteliales estimuladas con histatina-1

Previamente, Torres et al. (2017) evidenciaron la fosforilación de ERK 1/2 en células endoteliales estimuladas con histatina-1 a distintos tiempos. Es por ello, que en este objetivo se propuso evaluar si dicha fosforilación es dependiente de VEGFR-2. De este modo, se sometieron células endoteliales EA.hy926 al estímulo de histatina-1 por 30 minutos, tanto en ausencia, como en presencia del inhibidor ZM313881. Lamentablemente, no fue posible obtener datos concluyentes, debido a falta en el número muestral. Sin embargo, existió una clara tendencia de disminución en la fosforilación de ERK 1/2 cuando se utilizó el inhibidor específico en presencia de histatina-1 (Figura 14A). También se determinó si p38 podría estar involucrada como vía de señalización, ya que esta MAP kinasa se asocia a la actividad del receptor (Abhinand et al., 2016). Al igual que el experimento anterior, no fue posible realizar un número muestral que permitiera concluir respecto de los resultados. Sin embargo, al analizar la

tendencia es posible ver que p38 no tuvo aumentos pronunciados en su fosforilación (Figura 14 B).

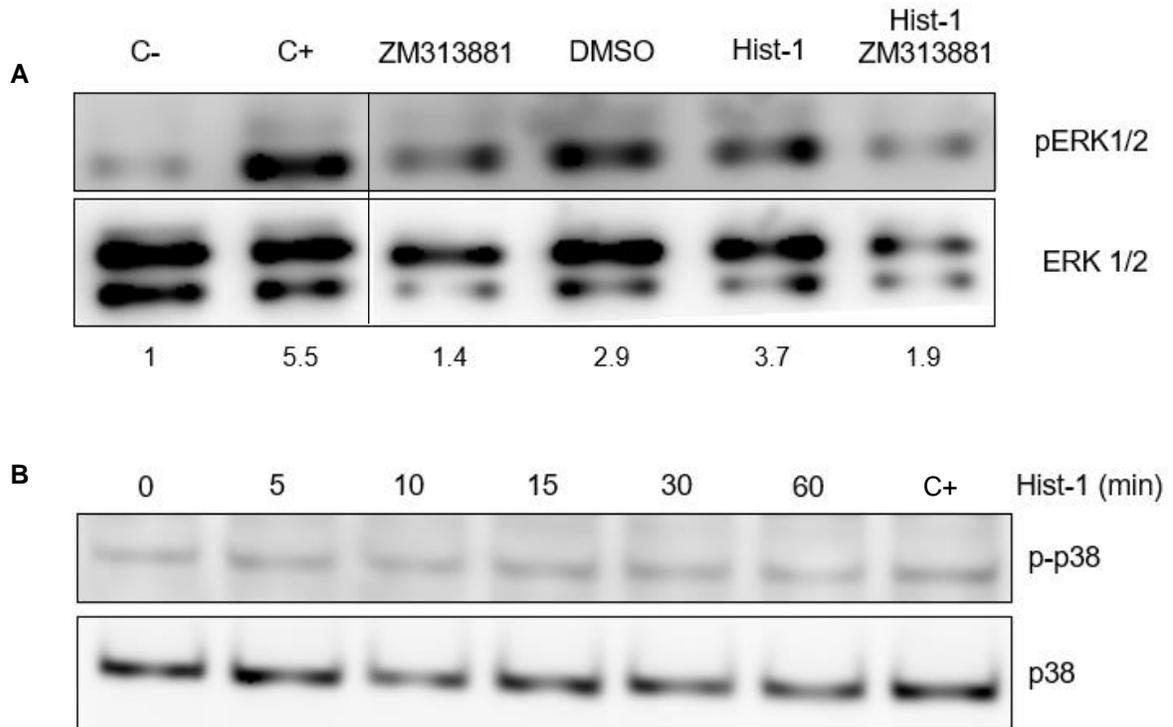


Figura 14. Fosforilación de p38 y ERK 1/2. (A) Western blot de la forma fosforilada y total de ERK 1/2, extraída de células EA.hy926 (n=1), estimuladas con histatina-1 durante 60 minutos en presencia y ausencia del inhibidor ZM313881. Los números bajo el panel indican valores de densitometría de imágenes, relativos a la condición control negativo (-). (B) Western blot de la forma fosforilada y total de p38 extraída de células EA.hy926 (n=1). Como control positivo se usó DMEM suplementado con 5% v/v de suero.

VI.3. Objetivo específico 3

DETERMINAR SI EXISTE UNIÓN ENTRE HISTATINA-1 Y VEGFR-2.

VI.3.1. Co-localización entre histatina-1 y VEGFR-2

La observación de que histatina-1 induce fosforilación de VEGFR-2 en Y801 (Objetivo 2) es intrigante, ya que se ha reportado previamente que éste es uno de los primeros eventos ocurren en la cadena de fosforilación, por lo que se le atribuye únicamente a unión por ligando (Blanes et al., 2007; Wang et al., 2020). Esta situación nos llevó a plantear que histatina-1 podría estar uniéndose directamente a VEGFR-2. En una primera aproximación, se realizaron ensayos de co-localización por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayos de proximidad *in situ* (ensayo de ligación por proximidad o PLA, por sus siglas en inglés, *proximity ligation assay*), de manera de evaluar asociación espacial entre histatina-1 y VEGFR-2.

Dado que el anticuerpo disponible contra histatina-1 no es recomendado para IFI (Santa Cruz Biotechnologies, sc98945) y con el fin de lograr un buen marcaje, decidimos utilizar histatina-1 modificada con una cola de poli-histidina (His₆) en la posición N-terminal del péptido, de modo que nos permitiese usar un anticuerpo primario contra His₆ para detectar histatina-1. Para comprobar que esta modificación no afectó la actividad de histatina-1, se realizaron ensayos de migración en presencia de His₆-histatina-1, demostrando que el efecto promigratorio se mantiene intacto (Figura 15A). Una vez validado el modelo, se determinó si histatina-1 y VEGFR-2 co-localizan, estimulando células EA.hy926 con His₆-histatina-1 durante 5 minutos y se realizó el marcaje de los blancos, utilizando anticuerpos primarios anti-His₆ y anti-VEGFR-2. Los resultados indican que, al analizar la fluorescencia de ambos, se evidenció la co-localización de estas moléculas (Figura 15B). Además, se realizó una IFI marcando Y801 fosforilada en VEGFR-2, para determinar si el resultado anterior era reproducible y posible para detectar el receptor activado. De esta forma, se determinó la co-

localización entre ambas proteínas a los tiempos 1, 2 y 5 minutos post-estímulo con His₆-histatina-1. El análisis de las imágenes demostró que en los tiempos 2 y 5 minutos post-estímulo, el marcaje de la fosforilación de Y801 co-localizó con el de His₆-histatina-1, por ende, el estímulo de ésta indujo la fosforilación de VEGFR-2 y ambas señales co-localizaron bajo estas condiciones (Figura 15C, D).

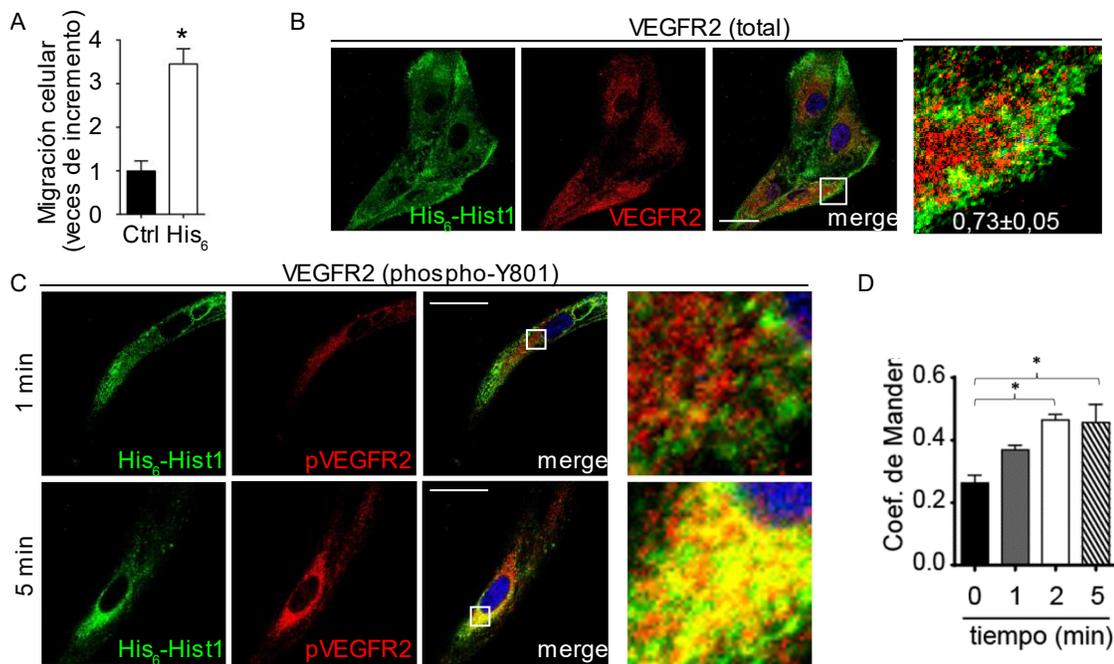


Figura 15. Co-localización de VEGFR-2 e histatina-1 en células endoteliales. (A) Migración celular inducida por histatina-1 con modificación His-6 (His₆) a concentración 10 μ M en células EA.hy926. (B) Co-localización (amarillo) entre histatina-1 con modificación His-6 (His₆-Hist1, verde) y VEGFR-2 (VEGFR2, rojo) en células EA.hy926, luego de un estímulo de 5 minutos con His-6-histatina-1 10 μ M. El número indicado dentro del panel derecho (magnificación) indica el Coeficiente de Mander's, promediado de 3 experimentos independientes. (C) Co-localización entre His6-histatina-1 y fosfo-VEGFR-2 (pY801 VEGFR2, rojo) en células EA.hy926, luego de estímulo con his6-histatina-1 a 1 y 5 minutos. (D) Coeficiente de Manders de la co-localización a 1, 2 y 5 minutos de estímulo con His6-histatina-1. Los datos corresponden a la cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar, * $p < 0,05$).

VI.3.2. Ensayo de ligación por proximidad (PLA)

Si bien hemos demostrado que VEGFR-2 e histatina-1 co-localizaron, se necesitan experimentos con una resolución más acotada en cuanto a distancias, por lo que el siguiente paso experimental fue determinar si existe una resolución superior a lo ofrecido por la inmunofluorescencia indirecta entre ambas moléculas. Con este fin, se propuso realizar el ensayo de PLA, luego del tratamiento con His₆-histatina-1 en células EA.hy926, nuevamente usando anticuerpos dirigidos contra His₆ y fosfo-Y801-VEGFR-2. En la Figura 16A se muestran las condiciones, no tratada (NT), tratamiento con His₆-histatina-1 e histatina-1 no marcada con His₆ (no marcada), seguido de detección con los respectivos anticuerpos (anti-His₆ y anti-fosfo-Y801-VEGFR-2). Los resultados mostraron que hubo una presencia significativa de marca (*spots*) positivos en la condición tratada y ambos anticuerpos, a diferencia de las otras condiciones con una aparición despreciable o nula de *spots* (Figura 16B). De esta forma, se concluye que histatina-1 y VEGFR-2 se encuentran en cercanía espacial, co-localizando en células endoteliales.

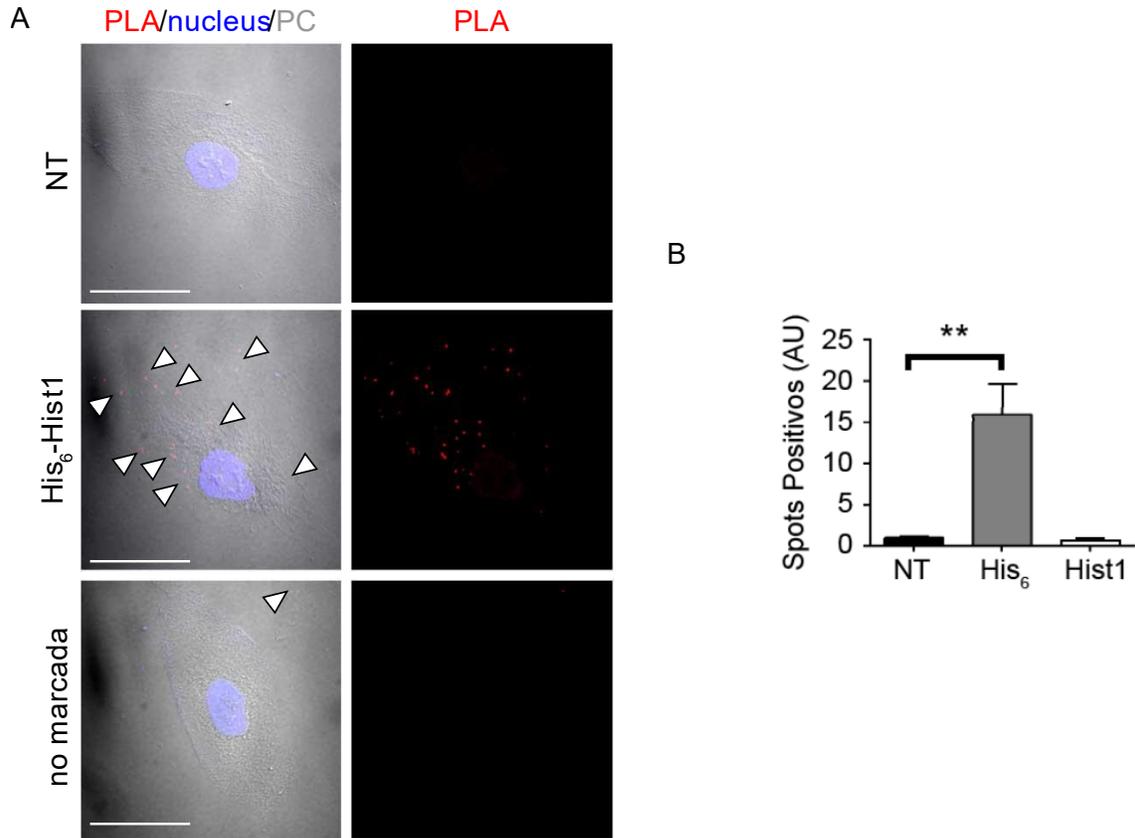


Figura 16. Ensayo de ligación por proximidad entre histatina-1 y VEGFR-2 en células endoteliales. Experimento realizado estimulando a células EA.hy926 con histatina-1 o His₆-histatina-1 10μM por 5 minutos. (A) Imagen representativa de spots de proximidad entre histatina-1 y fosfo-Y801-VEGFR-2 en células EA.hy926. (B) Cuantificación de spots en condición no tratada (NT), His₆-histatina-1 (His₆) e histatina-1 wt (Hist1). Los datos corresponden a la cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio ± error estándar, *p<0,05).

VI.3.3. Inmunoprecipitación de VEGFR-2

En continuidad con lo planteado anteriormente y para evaluar si histatina-1 y VEGFR-2 son capaces de asociarse en un complejo, se propuso realizar experimentos de co-inmunoprecipitación, utilizando como carnada a histatina-1 frente a un extracto de células EA.hy926. Para ello, se prepararon beads de proteína A pre-cubiertos con anticuerpo anti-His₆ (beads-A-α-His₆). A diferencia

de las inmunoprecipitaciones convencionales, se decidió cargar las beads-A- α -His₆ con His₆-histatina-1, y de este modo, se usó para determinar si VEGFR-2 endógeno, es decir, proveniente de células EA.hy926, es precipitado por la incubación con estas beads. Al incubar el extracto con las beads-A- α -His₆, los resultados indican que fue posible pesquisar a VEGFR-2 a través de este método, hallazgo que no ocurre cuando His₆-histatina-1 no se encuentra cargada en las beads (anticuerpo α -His₆ sólo, Figura 17).

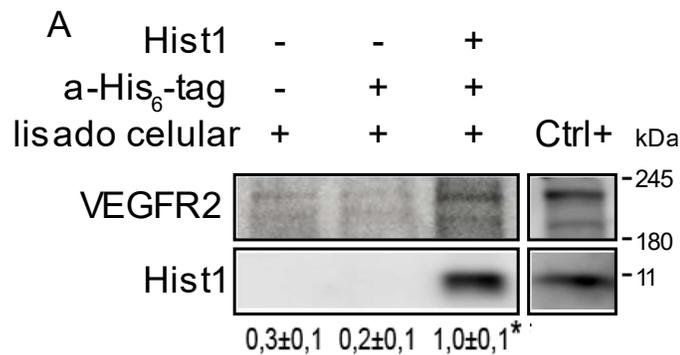


Figura 17. Inmunoprecipitación de VEGFR-2. (A) Western blot de inmunoprecipitación de VEGFR-2 utilizando histatina-1 como carnada. En los carriles se encuentran: (1) el extracto de células EA.hy926, (2) extracto de EA.hy926 más beads cargadas con anticuerpo anti-His₆ tag, (3) extracto de EA.hy926 más beads cargadas con anticuerpo e His₆-histatina-1. Los datos numéricos corresponden a la densitometría y cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar, * $p < 0,05$).

VI.3.4. Pulldown de histatina-1 y VEGFR-2

Los ensayos de inmunoprecipitación demostraron que histatina-1 y VEGFR-2 tienen una asociación en un complejo proteico. Sin embargo, para determinar si hay interacción directa entre estas dos moléculas, se realizaron ensayos de pulldown con proteínas purificadas en solución. Para llevar a cabo esto, se utilizó VEGFR-2 recombinante, con una modificación en su porción C-terminal, donde se reemplazó la región transmembrana y citosólica por la cadena Fc de inmunoglobulina humana (LS-G47161-50, LSBio, Seattle, USA). Es necesario mencionar que VEGFR-2 recombinante tiene un peso de 180 KDa, en electroforesis en condiciones denaturantes, esto debido a las modificaciones que presenta la estructura. Esta estrategia permitió acoplar VEGFR-2 directamente a las beads-A, siendo posteriormente incubado con las proteínas sintéticas histatina-1 (Figura 18A), His₆-histatina-1 (Figura 18B) o con un péptido control, de secuencia “Scramble” de histatina-1, también acoplado a His₆ (Figura 18C). De esta forma, cuando se incubaron las beads-A-VEGFR-2 con histatina-1, se evidenció, mediante la técnica de Western blot, la precipitación de ésta, no así cuando se usaron las beads-A (sin acoplar VEGFR-2) (Figura 18A). Mismo hecho ocurrió cuando se utilizó His₆-histatina-1 en lugar de histatina-1 (Figura 18B). A diferencia de lo anterior, cuando se incubaron las beads-A-VEGFR-2 con el péptido His₆-scramble no se evidenció precipitación de este último (Figura 18C).

Alternativamente, ya que se disponía del péptido histatina-1 modificado con una cola His₆, se planteó realizar la misma aproximación, pero de manera inversa, esta vez usando como carnada a His₆-histatina-1. De este modo, esferas de níquel-NTA se cargaron con His₆-histatina-1 y posteriormente se incubaron con VEGFR-2-Fc en solución, observando que, al igual que los ensayos anteriores, VEGFR-2 es precipitado por las beads de níquel cargado con His₆-histatina-1 (Figura 18D). De manera interesante, resultados similares se obtuvieron al usar histatina-1 (sin cola His₆), situación que puede ser explicada por la capacidad inherente de histatina-1 de unirse al níquel (Khurshid et al., 2017). Estos

resultados, en su conjunto, indican que histatina-1 se une directamente a VEGFR-2.

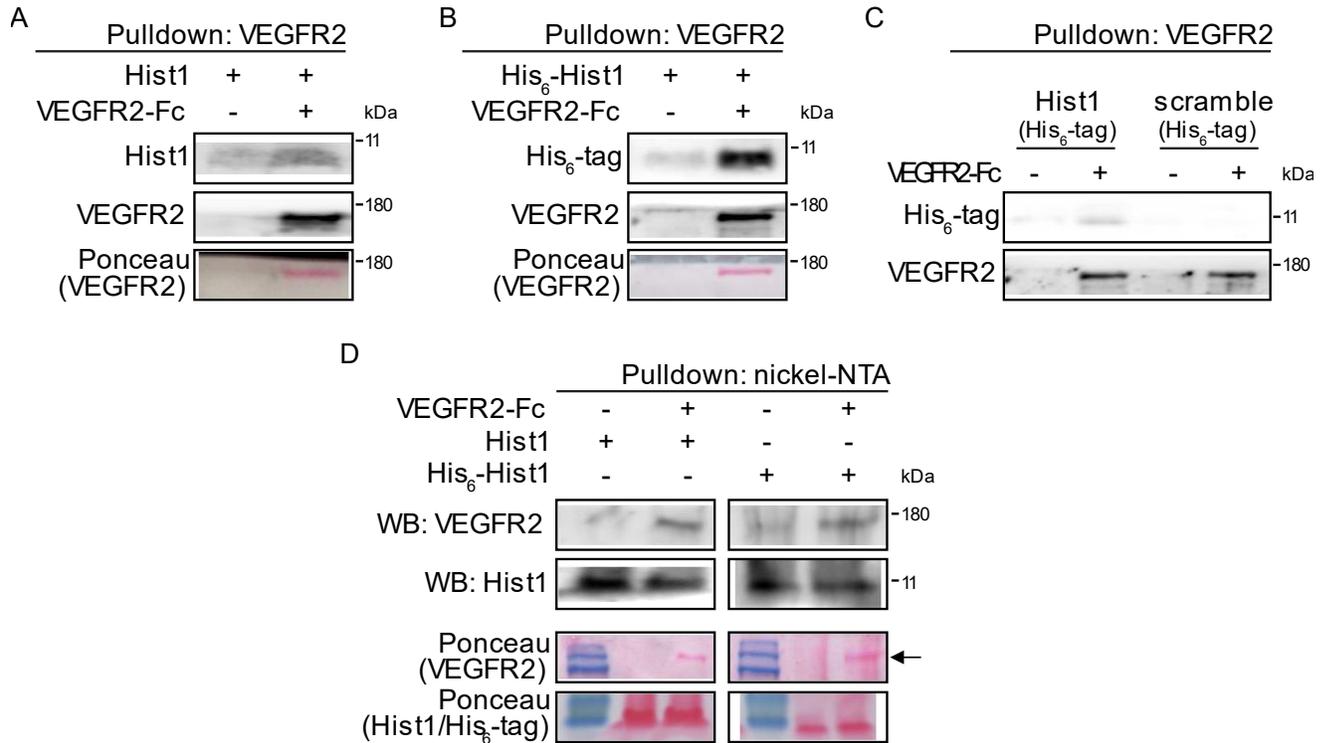


Figura 18. Pulldown de histatina-1 y VEGFR-2 puros. Identificación por Western blot y tinción de rojo ponceau de VEGFR-2-Fc e histatina-1. Pulldown de histatina-1 (Hist1) utilizando VEGFR-2-Fc como carnada en beads cargadas con proteína G para determinar la captura de (A) histatina-1 wt, (B) His₆-histatina-1 e (C) His₆-histatina-1 y péptido scramble. (D) Pulldown de VEGFR-2-Fc realizado con beads de níquel utilizando como carnada a histatina-1 y His₆-histatina-1 para capturar VEGFR-2 Fc. Para cada evaluación, se realizaron 3 experimentos independientes. Además de los ensayos de Western blot, se muestran las respectivas tinciones de Rojo Ponceau para cada condición.

VI.3.5. Ensayo de pinzas ópticas entre VEGFR-2 e histatina-1

Para tener una aproximación alternativa y caracterizar de mejor manera la interacción entre histatina-1 y VEGFR-2, se realizaron ensayos de pinzas ópticas, los cuales permiten además obtener parámetros cinéticos (Sánchez et al., 2022). Para ello, se cargaron beads de proteína G de distinto tamaño con ambas moléculas, según se detalla en la metodología y se representa en el esquema (Figura 19D). El acercamiento y la separación de estas moléculas con movimientos nanométricos permite determinar la frecuencia de adhesión, la fuerza de ruptura y la distancia, y con estos datos es posible determinar parámetros cinéticos. En primer lugar, se determinó la frecuencia con la que ocurre la adhesión durante el acercamiento de ambas beads, tanto en la condición control (bead de menor tamaño cargada con VEGFR-2 y bead de mayor tamaño cargada sólo con el anticuerpo anti-His₆), como en la condición experimental (bead de menor tamaño cargada con VEGFR-2 y bead de mayor tamaño cargada con His₆-histatina-1, a través del anticuerpo anti-His₆). Como era de esperar, la frecuencia de adhesión fue significativamente mayor cuando se encuentran ambas moléculas cargadas en sus respectivas beads (condición experimental) (Figura 19A), en comparación con la condición control. A partir de los datos, es posible distribuir los eventos de adhesión de acuerdo con su fuerza de ruptura, y de este modo, se determinó la fuerza media de ruptura, que correspondió a 20 pN (Figura 19B). Considerando la frecuencia de distribución de los eventos de adhesión respecto de la fuerza de ruptura, fue posible obtener datos de *lifetime*, utilizando el ajuste de Dudko-Hummer-Szabo sobre estos datos (datos no mostrados). Los parámetros obtenidos a través del ajuste fueron: K_{off} ($0,20 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$), ΔG^{++} ($3,98 \pm 0,27 \text{ k}_B\text{T}$) y la distancia para generar la ruptura de la interacción Δx^{++} ($0,24 \pm 0,03 \text{ nm}$) (Fig. 19C).

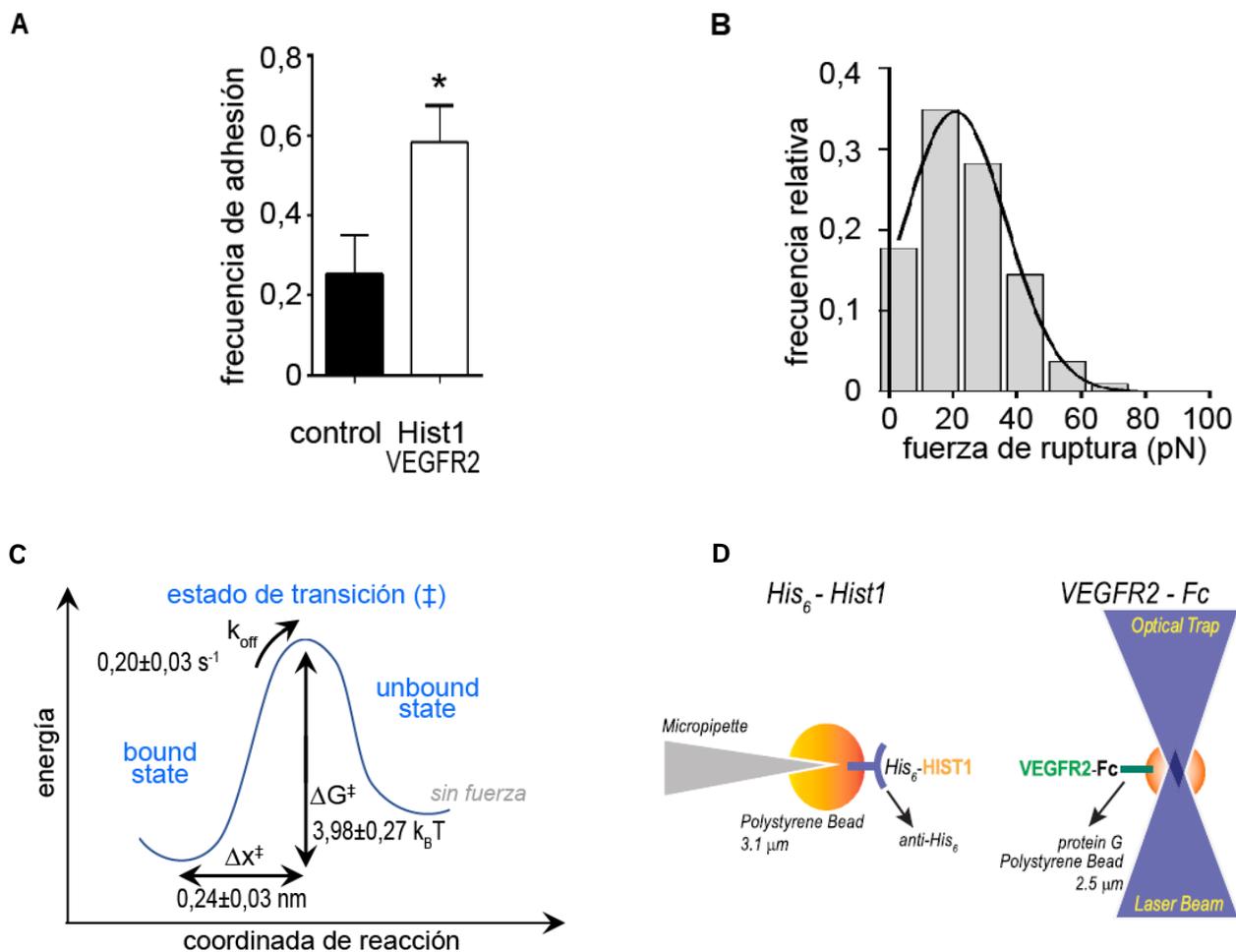


Figura 19. Interacción proteína-proteína entre histatina-1 y VEGFR-2 en pinzas ópticas. (A) Gráfico de frecuencia de adhesión en condición control (presente únicamente His₆-histatina-1 en las beads), y con la presencia de ambas moléculas. (B) Distribución de los eventos obtenidos en (A), de acuerdo a la fuerza de ruptura ejercida en cada evento. (C) Mapa energético para la unión entre His₆-Histatin-1/VEGFR2-Fc donde se muestra la constante de tasa disociación (k_{off}), distancia al estado de transición (Δx^\ddagger) y la energía libre de activación (ΔG^\ddagger). Los datos corresponden a la cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar, * $p < 0,05$). (D) Diseño experimental de pinzas ópticas para la interacción His₆-Histatin-1/VEGFR2-Fc.

VI.3.6. Modelamiento molecular de la interacción entre histatina-1 y VEGFR-2

Ante los resultados obtenidos, es necesario dar una explicación a la unión entre histatina-1 y VEGFR-2. Para dar respuesta, en primer lugar, utilizamos la información respecto de la interacción entre VEGFR-2/VEGF-A que se encuentra descrita con datos de cristalización, según Brozzo et al. (2012). En ésta se indica que la unión ocurre entre los dominios D2-D3 del receptor y que los residuos F17, Y21 y Y25 de VEGF-A son críticos para esta unión. Con esta información, realizamos un alineamiento estructural entre VEGF-A e histatina-1 con el fin de determinar si estos residuos se encontraban analógicamente posicionados en la secuencia de histatina-1. Los resultados indican que histatina-1 contiene los residuos F26, Y30 y Y34, los cuales están posicionados analógicamente a la secuencia de VEGF-A (Figura 20A). Para evaluar la importancia de estos residuos en la posible interacción histatina-1/VEGFR-2, se realizaron experimentos de modelamiento *in silico*. En primer lugar, fue necesario obtener la estructura 3D de histatina-1 mediante modelamiento por homología (ya que ésta no se encuentra descrita, ni cristalizada), arrojando una pequeña porción de alfa hélice rodeada de colas aleatorias (*random coil*) en el resto de su estructura (Figura 20B). Con estos datos, se realizó un docking molecular entre histatina-1 y la estructura cristalizada de VEGFR-2, específicamente los dominios D2 y D3 (datos no mostrados).

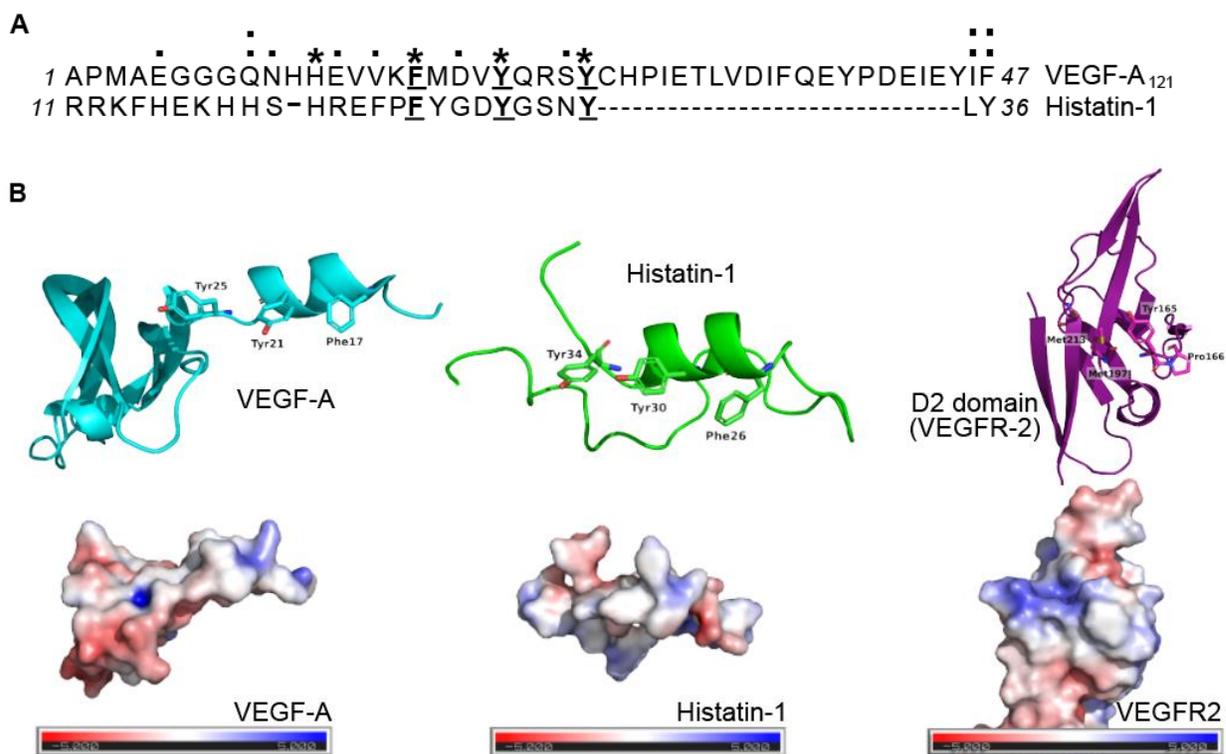


Figura 20. Modelamiento estructural 3D de histatina-1, VEGF-A y dominio D2-D3 de VEGFR-2. (A) Alineamiento de secuencia aminoacídica entre VEGF-A e histatina-1. (B) Estructura 3D de histatina-1(modelamiento por homología), VEGF-A (cristalizada) y dominios D2-D3 de VEGFR-2 (cristalizada), en la parte inferior se muestra el mapa de potencial electrostático.

Una vez determinada la estructura y la posición de inicio, se lanzó una dinámica molecular entre histatina-1 y los dominios D2-D3 de VEGFR-2. La posición e interacción que ocurre entre ambas es similar a las descritas para VEGF-A. Específicamente, la dinámica indicó la existencia de puentes de hidrógeno entre los residuos F26, Y30, Y34 y Y36 de histatina-1 y los residuos N38, H133, F165, P166, Q210, M213 e I215 de VEGFR-2 (Figura 21A, B). Interesantemente, los residuos mencionados también son descritos en la interacción de VEGF-A con el receptor, por lo que nuestros resultados de dinámica molecular podrían explicar cómo histatina-1 estaría actuando a través de VEGFR-2.

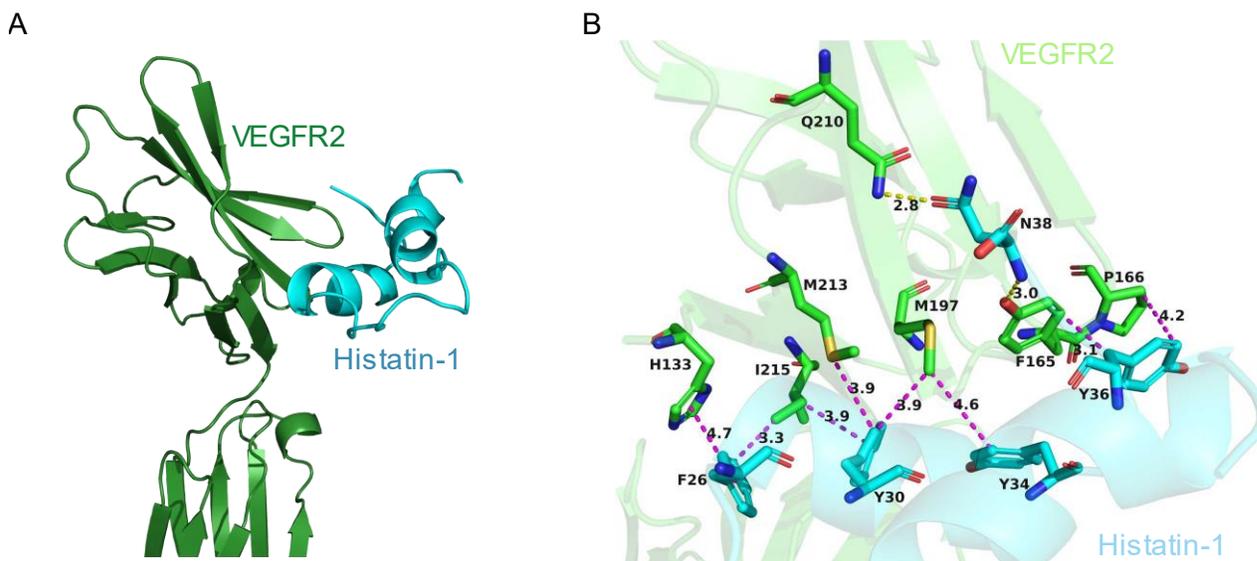


Figura 21. Interacción entre histatina-1 y VEGFR-2. (A) Imagen representativa de la interacción *in silico* entre histatina-1 y VEGFR-2 obtenida por dinámica molecular. (B) Interacciones descritas en la dinámica molecular entre histatina-1 y VEGFR-2; en púrpura se señalan, tanto puentes de hidrógeno, como interacciones hidrofóbicas, acompañadas de las distancias en Angstrom (negro). En negro se señalan los residuos que interactúan y sus distancias.

VI.4. Objetivo específico 4

EVALUAR LA RELEVANCIA DE LOS RESIDUOS F26, Y30 Y Y34 DE HISTATINA-1 EN LA UNIÓN A VEGFR-2 Y LA MIGRACIÓN CELULAR ENDOTELIAL.

VI.4.1. Dinámica molecular de la mutante triple alanina de histatina-1

Para determinar si los residuos analógicos descritos en la estructura de histatina-1 afectan realmente a la interacción con el receptor, se realizó una mutación *in silico* de los residuos F26, Y30 y Y34 por alanina (A). De esta forma, se realizó un nuevo análisis de dinámica molecular entre los dominios D2-D3 de VEGFR-2 y la triple mutante de histatina-1 (Figura 22). Los resultados indican que, en comparación con histatina-1 wild type (wt), la triple mutante pierde totalmente su estabilidad en el sitio D2-D3, como indica la gráfica del RMSD (del inglés *root-mean-square deviation*). Además, las interacciones descritas para histatina-1 se pierden totalmente con la mutante, dando así interacciones sin sentido en referencia a lo descrito en la cristalización VEGFR-2/VEGF-A (Figura 22B y 22C).

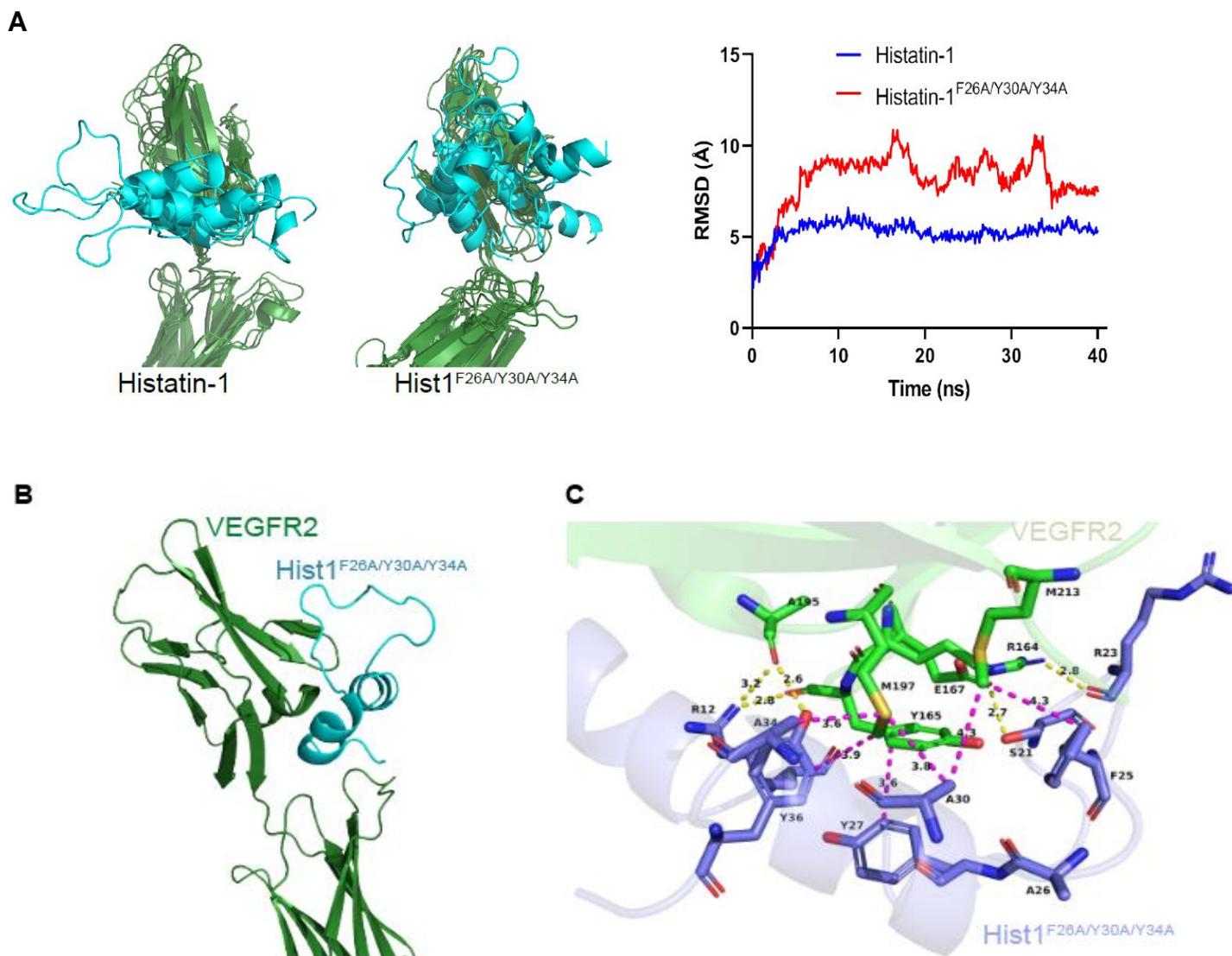


Figura 22. Dinámica molecular de histatina-1. (A) Izquierda- Posiciones obtenidas durante la dinámica para histatina-1 e histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A}(calipso) con VEGFR-2 (D2-D3, verde). (A) Derecha- Datos de RMSD desde la posición inicial de la dinámica hasta la posición final (tiempo de corrido, 40 ns). (B) Posición final de histatina-1 triple mutante con VEGFR-2 obtenidas por dinámica molecular. (C) Interacciones descritas en la dinámica entre histatina-1 triple mutante y VEGFR-2, en púrpura se señalan tanto puentes de hidrógeno, como interacciones hidrofóbicas, acompañadas de las distancias en Angstrom (negro). En negro se señalan los residuos que participan de la interacción, azul para histatina-1 triple mutante y verde para VEGFR-2. Los datos corresponden a la cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar, * $p < 0,05$).

VI.4.2. Efecto de la mutación F26A/Y30A/Y34A en la unión de histatina-1 y VEGFR2 *in vitro*

Nuestros análisis *in silico* indican que los residuos F26, Y30 y Y34 son importantes para la interacción entre histatina-1 y VEGFR-2. Para validar estas observaciones, se realizaron experimentos de pulldown *in vitro*, usando una triple mutante de histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A}, obtenida por síntesis química, al igual que histatina-1 wild type, según lo descrito en materiales y métodos. En la Figura 23 se evidencia como VEGFR-2 (acoplado a Fc) y usado como carnada, arrastró consigo a histatina-1 (*wild type*), mientras que esta situación no ocurrió con la triple mutante de histatina-1 (*mut*), la cual no fue detectada mediante Western blot (Figura 23). Estos resultados permiten confirmar que los residuos F26, Y30 y Y34 de histatina-1 son necesarios para su unión a VEGFR-2.

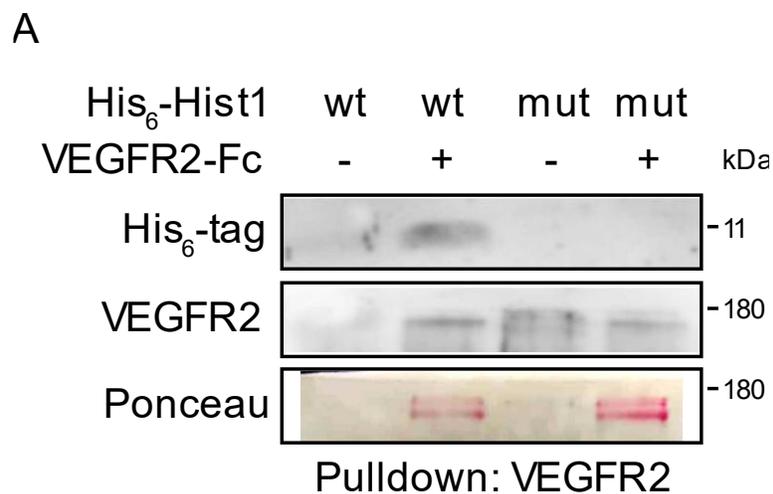


Figura 23 Pulldown de histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A}. (A) Western blot de pulldown de histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A} (His₆-Hist1 mut) utilizando a VEGFR2-Fc como carnada. Se utilizó His₆-histatina-1 como control positivo (His₆-Hist1 wt). Se muestra en rojo Ponceau a VEGFR2-Fc. Los datos representan a 3 experimentos independientes.

VI.4.3. Efecto de la mutación F26A/Y30A/Y34A en la migración celular endotelial y la tubulogénesis inducida por histatina-1

Finalmente, para evaluar si los residuos F26, Y30 y Y34, descritos como importantes para la interacción entre histatina-1 y VEGFR-2, son relevantes para la funcionalidad de histatina-1 en células endoteliales, se realizaron experimentos *in vitro*, tanto de migración, como de tubulogénesis, determinando si la mutación de estos residuos afectaba estas respuestas. Para ello, las células EA.hy926 se cultivaron y sometieron a ensayo de Transwell en presencia de histatina-1 wt y la triple mutante. Nuestros resultados indican que no existieron diferencias significativas entre las condiciones control y triple mutante, a diferencia de lo ya reportado con histatina-1 wt (Figura 24 A).

Por otro lado, estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que histatina-1 induce la formación de túbulos endoteliales *in vitro*, demostrado mediante el ensayo de tubulogénesis en matrigel (Torres, Díaz, et al., 2017). De este modo, usando esta aproximación, se evaluó el efecto de la mutación de histatina-1 en la formación de estas estructuras. Como se muestra en la Figura 24 B, histatina-1 wt efectivamente indujo la formación de túbulos. Sin embargo, cuando la condición fue histatina-1 triple mutante, no hubo diferencias significativas respecto del control (Figura 24 B).

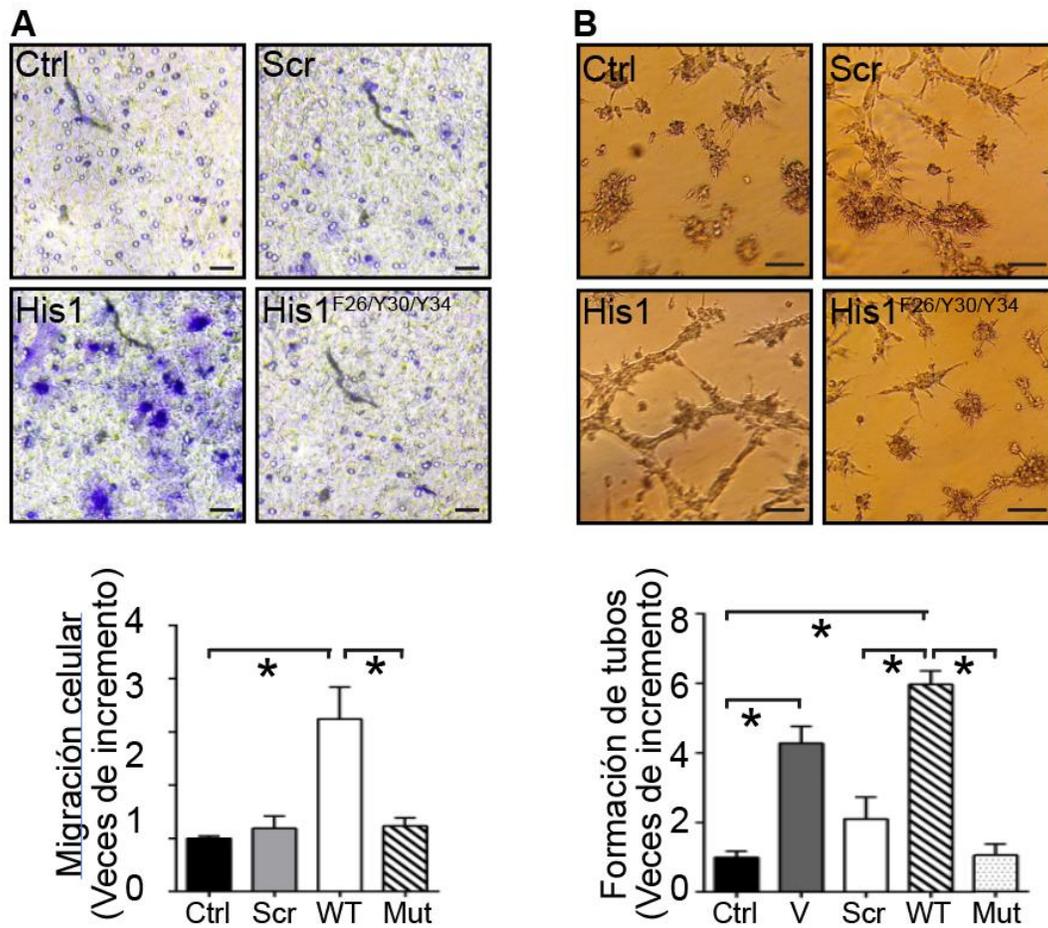


Figura 24 Migración y tubulogénesis de células EA.hy926 estimuladas con histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A}. (A) Ensayo de transwell de células endoteliales EA.hy926 estimuladas con histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A} 10 μ M (Mut), utilizando como control positivo histatina-1 (wt) y control negativo péptido scramble (Scr). El promedio de células contadas por campo para cada condición fue para control sin tratamiento (Ctrl = 5), Scr (5), WT (15) y Mut (5). (B) Ensayo de tubulogénesis *in vitro* de células EA.hy926 estimuladas con histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A}, utilizando como control positivo histatina-1 (wt) y control negativo, el péptido scramble (Scr). Los datos corresponden a la cuantificación de 3 experimentos independientes (promedio \pm error estándar, * $p < 0,05$).

VII. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que histatina-1 induce la fosforilación de ERK 1/2 en células endoteliales, y también favorece la migración y adhesión de este mismo modelo celular, además de promover la angiogénesis (Torres et al, 2017). Estas evidencias nos permitieron proponer, como receptor de histatina-1 a VEGFR-2, debido a que su activación lleva a la activación de la misma vía de señalización, gatillando sus efectos pro-migratorios en células endoteliales. De esta forma, en experimentos de inhibición específica y silenciamiento del receptor, el efecto pro-migratorio de histatina-1 fue dependiente de VEGFR-2 en células endoteliales, tanto en HUVEC (cultivo primario de células endoteliales humanas) como EA.hy926 (cultivo de línea celular endotelial). VEGFR-2 no solo se expresa en células endoteliales, sino que también en otros modelos, como queratinocitos (Figura 12). Sin embargo, no tiene el mismo impacto como lo es en las células endoteliales. Esto nos permite cuestionar si es posible que histatina-1 esté actuando a través de VEGFR-2 en otros modelos. Logramos demostrar que el efecto pro-migratorio es exclusivo para el modelo de células endoteliales, ya que, como se demostró en la figura 12, al utilizar el inhibidor específico ZM323881 (Whittles et al., 2002), en células OKF6 (queratinocitos orales), no se afectó la migración celular. Por otro lado, durante el desarrollo de esta tesis, se describió como receptor de histatina-1 al receptor sigma-2 en células HeLa y HCE, ambas líneas de modelo epitelial (Son et al., 2021) y a receptores sensibles PTx en queratinocitos (Oudhoff et al., 2008). El receptor sigma-2 está asociado a efectos pro-migratorios, por lo que tiene sentido que histatina-1 pueda unirse a este receptor en el modelo celular epitelial. Sin embargo, cabe destacar que los ensayos realizados, tanto en la descripción de sigma-2, como el uso del inhibidor PTx en modelo epitelial, son de efectos en períodos de tiempo más largos, de 16-24 horas, tanto en ensayos en cámara de Boyden, como cierre de herida. Por lo que los efectos de estímulo con histatina-1 a períodos más largos pueden estar asociados a este tipo de receptores (sigma-2 y acoplados a proteína-G), y en

periodos cortos, a VEGFR-2, como lo proponemos en este trabajo. De todos modos, es necesario comprobar esta hipótesis realizando ensayos en modelos epiteliales, inhibiendo a VEGFR-2, ya que nuestra propuesta sólo está asociada al modelo endotelial. Una manera de dar explicación a que histatina-1 tenga la posible capacidad de unirse a distintos receptores es su tamaño y estructura. Al ser un péptido de tan solo 38 residuos y no adoptar una estructura secundaria estable, permite la posibilidad de que pueda unirse a otros blancos al tener una mayor flexibilidad estructural.

Otro planteamiento, luego de determinar la dependencia de VEGFR-2 por parte del efecto pro-migatorio de histatina-1, fue si la activación del receptor es vía activación directa (unión receptor-ligando) o indirecta (trans-activación) ya que existen evidencias de transactivación del receptor (Petreaca & Min Yao, Yan Liu, Kathryn DeFea, 2007; Tanimoto et al., 2002). La fosforilación de Y801 nos indica que el receptor está siendo activado por unión ligando-receptor, como se ha reportado (Blanes et al., 2007). Además, cumple con una cinética similar a la de VEGF-A, induciendo una fosforilación a los 2 minutos posterior al estímulo. En apoyo de esta evidencia, planteamos demostrar que histatina-1 es capaz de unirse a VEGFR-2 directamente. Es por ello, que, en una primera exploración, determinamos la cercanía entre estas dos moléculas a través de la microscopía de fluorescencia. Sin embargo, el límite de detección en cuanto a distancia en ambos fluoróforos es de un máximo de 200 nm aproximadamente. Desde el punto de vista de interacción directa, es una distancia considerablemente amplia, por lo que también realizamos PLA. En su conjunto, los ensayos de IFI y PLA indican que histatina-1 y VEGFR-2 se encuentran en cercanía espacial en células endoteliales, y que su distancia es igual o menor a 40 nanómetros (límite de reacción para ensayo de PLA). Sin embargo, es discutible si histatina-1 pueda estar activando a VEGFR-2 a través de una liberación de VEGF-A u otro mecanismo indirecto al receptor. Ensayos de co-inmunoprecipitación demostraron que histatina-1 co-inmunoprecipita en conjunto con VEGFR-2

(Figura 17), y que además tiene afinidad y se une directamente a VEGFR-2 *in vitro*, demostrado a través de ensayos de pulldown con ambas moléculas purificadas (Figura 18). Más aún, fue posible determinar a través de la herramienta de pinzas ópticas, que la energía necesaria para separar la unión entre histatina-1 y VEGFR-2 es aproximadamente de 20 pN ($3,98 + 0,27 K_b T$) a una distancia de 2,4 Å, estos parámetros indican que es una unión débil y transitoria, pero específica y directa. Estos parámetros son los adecuados para las interacciones ligando-receptor (Williams, 2014). Además, la distancia concuerda con interacciones descritas entre VEGF-A y VEGFR-2, mediadas por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Brozzo et al., 2012). Surge la necesidad de explorar técnicas más apropiadas para determinar parámetros de cinética de unión, como constante de afinidad, de disociación y la estequiometría, ya que el ensayo que realizamos es limitado debido a que es clasificado como ensayo de interacción *in singulo* (Sánchez et al., 2022), donde sólo se ve interacción 1 a 1. También sería interesante realizar el ensayo de pinzas ópticas utilizando histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A} y poder comparar el parámetro de ambas condiciones, corroborando lo evidenciado en la dinámica molecular.

Para algunos de los ensayos mencionados, fue necesario utilizar una histatina-1 modificada con una cola de 6 histidinas, lo que nos permitió hacer seguimiento de histatina-1 en algunos de los experimentos diseñados en este trabajo, utilizando anticuerpo anti-His₆. Esta extensión fue añadida al extremo N-terminal de histatina-1, ya que sabíamos que la funcionalidad, al menos en células epiteliales, se atribuye a la sección C-terminal del péptido (Oudhoff et al., 2009). De este modo, demostramos que, aunque sea modificada este extremo, no hay cambios en la actividad pro-migratoria al estimular células endoteliales (Figura 15A). Así, fue posible explicar la actividad atribuida a su C-terminal y la unión a VEGFR-2 a través de experimentos *in silico*. En primer lugar, fue necesario asignarle estructura a la secuencia de histatina-1 (debido a que ésta no se encuentra cristalizada), a través del modelado por homología. La estructura

modelada arrojó una pequeña porción α -hélice, donde la otra parte de la secuencia estaba compuesta por *random coil*. Existe evidencia en dicróismo circular que concuerda con las descripciones que obtuvimos para la estructura de histatina-1, donde se muestra que, al someterla a un ensayo de dicróismo circular al péptido, su estructura es capaz de formar α -hélice con una gran porción de *random coil* (Bolscher et al., 2011).

Luego, los datos de dinámica molecular indicaron que histatina-1 se mantuvo estable una vez que interactuó con los dominios D2-D3 de VEGFR-2. Estas interacciones se compararon con lo registrado en la cristalización de la interacción de VEGF-A con VEGFR-2. Los residuos (F26, Y30 y Y34) presentes en histatina-1 interaccionaron en los dominios D2-D3 de VEGFR-2, según la dinámica molecular, e interesantemente, las interacciones descritas fueron similares a las evidenciadas con VEGF-A (Brozzo et al., 2012). Al realizar un análisis de alineamiento estructural, fue posible describir que estos residuos, presentes en histatina-1, se encontraron en una posición analógica a los residuos F17, Y21 y Y25 de VEGF-A que también interaccionaron con los dominios D2-D3 de VEGFR-2, siendo mencionados como gatillantes de la activación (Brozzo et al., 2012). Esto nos permite pensar que el mecanismo por el cual histatina-1 estaría actuando, es a través de estos residuos, uniéndose a los dominios D2-D3 de VEGFR-2 induciendo un cambio conformacional que deriva en el efecto promigratorio.

Es más, al realizar la mutación *in silico* de estos residuos, histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A} se perdió totalmente la estabilidad desde el punto inicial de la dinámica (dominio D2, donde se une VEGF-A), obteniendo interacciones sin sentido (Figura 13). Ensayos de pulldown con histatina-1 mutada (histatina-1^{F26A/Y30A/Y34A}) y VEGFR-2 puro, demuestran que la unión al receptor es totalmente dependiente de estos residuos, lo que conllevó a una pérdida total de la función cuando se estimuló a células endoteliales con histatina-1 mutada, tanto

en migración como tubulogénesis *in vitro* (figura 15). En su conjunto, estos resultados permiten proponer un modelo farmacodinámico de histatina-1 en la activación del receptor VEGFR-2 en el modelo de células endoteliales (Figura 16).

Desde el punto de vista de la interacción, teniendo en evidencia todos estos hallazgos, queda la necesidad de estudiar si histatina-1 dimeriza como lo hace VEGF-A, o si también tiene afinidad por las otras isoformas, como VEGFR-1, ya que VEGF-A también tiene afinidad por esta isoforma, o VEGFR-3, isoforma presente en células del sistema inmune como macrófagos y que se ha asociado a la respuesta inflamatoria (Yamashita et al. 2022). Por otro lado, también surge la interrogante de si histatina-1 es capaz de unirse y activar a VEGFR-2 heterodimerizado con VEGFR-1.

En nuestro trabajo, describimos mecanismos farmacodinámicos en las células endoteliales, células de gran relevancia en la reparación de heridas, sin embargo, quedan aristas por resolver en los otros modelos, ya que como demostramos, la activación de VEGFR-2 por parte de histatina-1, únicamente está vinculado a células endoteliales. Por otro lado, es interesante cómo este péptido es capaz de participar no únicamente en la modulación de la angiogénesis, sino que también en la fase inflamatoria. Durante el transcurso de este trabajo, fueron publicados datos donde se demuestra que histatina-1 es capaz de reducir la respuesta inflamatoria de macrófagos estimulados con LPS (Lee et al., 2021), disminuyendo la liberación de factores proinflamatorios como TNF- α , IL-1 β e IL-6. En el trabajo de Zheng et al. (2020), modelo de ratones con herida por quemadura se estimularon con histatina-1, demostrando nuevamente los efectos antiinflamatorios de este péptido, donde se inhibió la expresión TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Zheng et al, 2020). El impacto que tiene la aplicación de este péptido en el campo de la reparación tisular es alto, y es por ello que surge la necesidad de responder a estos y otros mecanismos relacionados con

histatina-1, con la finalidad de hacer un uso adecuado sin efectos secundarios en los pacientes o sus aplicaciones.

Histatina-1 es una molécula con un alto potencial en el campo de la medicina regenerativa (Brand et al., 2014; Dijk et al., 2018; Khurshid et al., 2017; Torres et al., 2018), ya que se ha evidenciado su actividad migratoria no sólo en células endoteliales, sino que también en queratinocitos (Oudhoff et al., 2008), fibroblastos (Oudhoff et al., 2009), e incluso favoreciendo la adhesión y diferenciación de células óseas (Castro et al., 2019; Sun et al., 2020). Debido a sus efectos, se han diseñado modelos de administración como la adición de histatina-1 a sustratos inertes y superficies de titanio (Sun et al., 2020), así como en polímeros de hidrogeles (Zhu et al., 2022), con el fin de ser aplicados en lesiones pertinentes a la reparación o migración de células blanco. En trabajos más recientes, se ha demostrado que histatina-1 favorece la angiogénesis en modelos de condición diabética (Cao et al., 2022). Sin embargo, hay muy poca evidencia respecto de los mecanismos moleculares y farmacológicos por los cuales actúa histatina-1. Esta información es necesaria para fortalecer y responsabilizar el uso terapéutico al cual se está destinando a esta molécula, y que este trabajo se encarga de aclarar en algunos aspectos, dando así la relevancia a nuestra investigación.

Además de las aplicaciones a humanos, también es posible extrapolar nuestros resultados al modelo animal, ya que existe evidencia de que el efecto de histatina-1 no está limitado a la misma especie donde es expresada. Evidencias en literatura muestran que histatina-1 es capaz de inducir efectos angiogénicos tanto en modelo de pollo (Torres, Díaz, et al., 2017) como en conejo (Oydanich et al., 2018), es posible explicar este fenómeno si la vía o receptor por el cual histatina-1 está actuando, es evolutivamente conservado. Precisamente, el receptor VEGFR-2 cumple con las características, ya que modula la angiogénesis (Abhinand et al., 2016) y también tiene dominios conservados

(Holmes & Zachary, 2005). De esta manera, las contribuciones farmacodinámicas de histatina-1 en esta tesis, no únicamente aportan a las futuras aplicaciones en humanos, sino que también en medicina veterinaria.

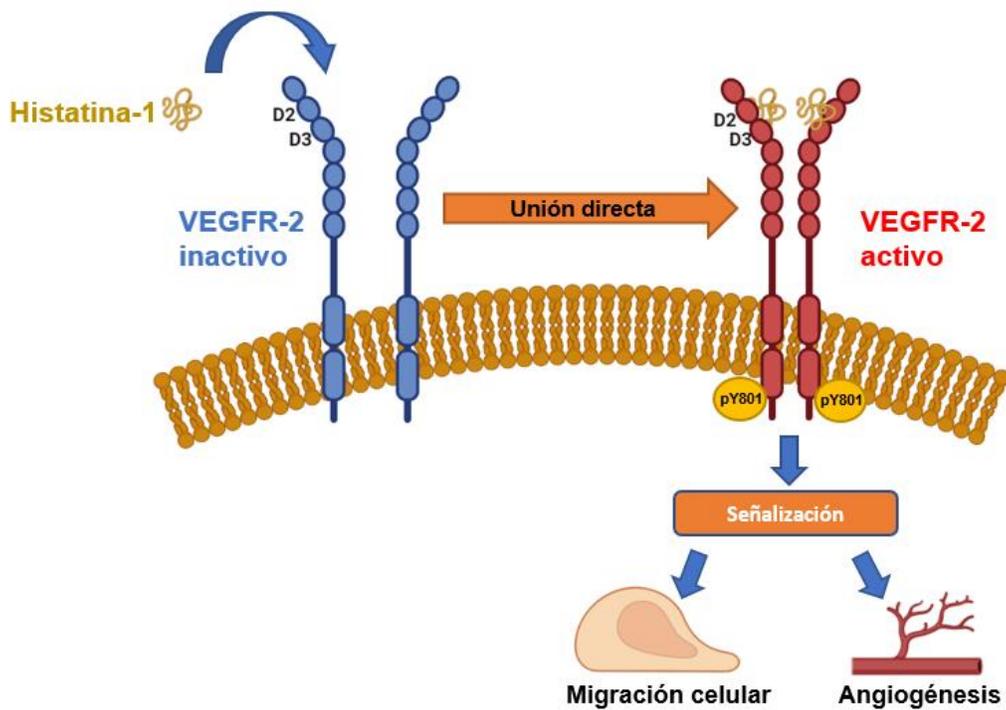


Figura 25 Mecanismo de acción de histatina-1 en la activación de VEGFR-2. Esquema representativo de la activación de VEGFR-2 mediante la unión de histatina-1 con los hallazgos obtenidos en este trabajo. Histatina-1 induce la activación de VEGFR-2 mediante la unión al dominio D2. Esta unión es dependiente de la presencia de los residuos F26, Y30 y Y34. Posteriormente, ocurre un cambio conformacional que induce la fosforilación de Y801 de VEGFR-2, lo que permite la activación de vías de señalización que promueven la migración y la angiogénesis.

VIII. CONCLUSIÓN

Histatina-1 es un péptido versátil, debido a su efecto en distintos tipos celulares. En este trabajo, describimos por primera vez al receptor para histatina-1 en células endoteliales. VEGFR-2 es activado por histatina-1 a través de su unión directa en los dominios D2-D3, principalmente por los residuos F26, Y30 y Y34, induciendo la fosforilación de la Y801 en VEGFR-2 y desencadenando el efecto pro-migratorio. Este perfil de unión es similar a como VEGF-A interactúa con VEGFR-2. Estos hallazgos contribuyen a entender el mecanismo molecular y la farmacodinamia de histatina-1 en el modelo endotelial, lo cual es una información de gran importancia para dar explicación a los procesos angiogénicos evidenciados por estímulos con histatina-1 y su participación en el proceso de reparación de herida. Esperamos que estos resultados contribuyan de gran manera al desarrollo de este péptido en sus usos farmacológicos terapéuticos.

IX. REFERENCIAS

- Abhinand, C. S., Raju, R., Soumya, S. J., & Arya, P. S. (2016). VEGF-A/ VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 10, 347–354. <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0352-8>
- Bao, P., Kodra, A., Tomic-canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P., & Brem, H. (2010). The role of VEGF in wound healing. *Journal of Surgical Research*, 153(2), 347–358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>.
- Bolscher JG, Oudhoff MJ, Nazmi K, Antos JM, Guimaraes CP, Spooner E, Haney EF, Garcia Vallejo JJ, Vogel HJ, van't Hof W, Ploegh HL, Veerman EC. Sortase A as a tool for high-yield histatin cyclization. *FASEB J*. 2011 Aug;25(8):2650-8. doi: 10.1096/fj.11-182212. Epub 2011 Apr 27. PMID: 21525488.
- Blanes, M. G., Oubaha, M., Rautureau, Y., & Gratton, J. P. (2007). Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10660–10669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609048200>
- Brand, H. S., Ligtenberg, A. J. M., & Veerman, E. C. I. (2014). Saliva and wound healing. *Saliva: Secretion and Functions*, 24, 52–60. <https://doi.org/10.1159/000358784>
- Brozzo, M. S., Bjelić, S., Kisko, K., Schleier, T., Leppänen, V. M., Alitalo, K., Winkler, F. K., & Ballmer-Hofer, K. (2012). Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. *Blood*, 119(7), 1781–1788. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390922>
- Cao, Y., Shi, X., Zhao, X., Chen, B., Li, X., Li, Y., Chen, Y., Chen, C., Lu, H., & Liu, J. (2022). Acellular dermal matrix decorated with collagen-affinity peptide accelerate diabetic wound healing through sustained releasing Histatin-1

- mediated promotion of angiogenesis. *International Journal of Pharmaceutics*, 624(January), 122017. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122017>
- Carpenter, G. H. (2013). The secretion, components, and properties of saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 267–276. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>
- Castilla, D. M., Liu, Z.-J., & Velazquez, O. C. (2012). Oxygen: Implications for Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 1(6), 225–230. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0319>
- Castro, M., Torres, P., Solano, L., Córdova, L. A., & Torres, V. A. (2019). Histatin-1 counteracts the cytotoxic and antimigratory effects of zoledronic acid in endothelial and osteoblast-like cells. *Journal of Periodontology*, October 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1002/jper.18-0644>
- Chen, L., Arbieva, Z. H., Guo, S., Marucha, P. T., Mustoe, T. A., & Dipietro, L. A. (2010). *Positional differences in the wound transcriptome of skin and oral mucosa. Table 1*, 1–15.
- Dellinger, M. T., & Brekken, R. A. (2011). *Phosphorylation of Akt and ERK1 / 2 Is Required for VEGF- A / VEGFR2-Induced Proliferation and Migration of Lymphatic Endothelium*. 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028947>
- Dijk, I. A. van, Veerman, E. C. I., Reits, E. A. J., Bolscher, J. G. M., & Stap, J. (2018). Salivary peptide histatin 1 mediated cell adhesion: a possible role in mesenchymal-epithelial transition and in pathologies. *Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0246>
- DiPietro, L. A. (2016). Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(5), 979–984. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0316-102R>
- Dreifke, M. B., Jayasuriya, A. A., & Jayasuriya, A. C. (2015). Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering C*, 48, 651–662. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.068>

- Godbout, J. P., & Glaser, R. (2006). Stress-induced immune dysregulation: Implications for wound healing, infectious disease and cancer. In *Journal of Neuroimmune Pharmacology* (Vol. 1, Issue 4, pp. 421–427). <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9036-0>
- Gouin, J. P., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2011). The Impact of Psychological Stress on Wound Healing: Methods and Mechanisms. In *Immunology and Allergy Clinics of North America* (Vol. 31, Issue 1, pp. 81–93). <https://doi.org/10.1016/j.iac.2010.09.010>
- Guo, S., & Dipietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
- Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
- Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy*, 34(3), 599–610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>
- Holmes, D. I., & Zachary, I. (2005). *The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease*. <http://genomebiology.com/2005/6/2/209>
- Lorgulescu, G. (2009). Saliva between normal and pathological. Important factors in determining systemic and oral health. *Journal of Medicine and Life*, 2(3), 303–307.
- Khurshid, Z., Najeeb, S., Mali, M., Moin, S. F., Raza, S. Q., Zohaib, S., Sefat, F., & Zafar, M. S. (2017). Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications in dentistry. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.027>

- Kim, D. E., Chivian, D., & Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.), 526–531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>
- Lee, S. M., Son, K. N., Shah, D., Ali, M., Balasubramaniam, A., Shukla, D., & Aakalu, V. K. (2021). Histatin-1 attenuates LPS-induced inflammatory signaling in RAW264.7 macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22157856>
- Li, L., He, Y., Zhao, M., & Jiang, J. (2013). Collective cell migration: Implications for wound healing and cancer invasion. In *Burns and Trauma* (Vol. 1, Issue 1, pp. 21–26). Oxford University Press. <https://doi.org/10.4103/2321-3868.113331>
- London, N., Raveh, B., Cohen, E., Fathi, G., & Schueler-Furman, O. (2011). Rosetta FlexPepDock web server - High resolution modeling of peptide-protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), 249–253. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr431>
- Martin, P., & Nunan, R. (2015). Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. In *British Journal of Dermatology* (Vol. 173, Issue 2, pp. 370–378). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/bjd.13954>
- Mateluna, C., Torres, P., Rodriguez–Peña, M., Silva, P., Matthies, D. J., Criollo, A., Bikker, F. J., Bolscher, J. G. M., Wilson, C. A. M., Zapata–Torres, G., & Torres, V. A. (2022). Identification of VEGFR2 as the Histatin-1 receptor in endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 201(April). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115079>
- Menke, N. B., Ward, K. R., Witten, T. M., Bonchev, D. G., & Diegelmann, R. F. (2007). Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.12.005>
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H. J., & Dehio, C. (1999). A novel

- vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO Journal*, 18(2), 363–374. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.363>
- Oudhoff, M. J., Bolscher, J. G. M., Nazmi, K., Kalay, H., Hof, W. van, Amerongen, A. V. N., & Veerman, E. C. I. (2008). Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *The FASEB Journal*, 22, 3805–3812. <https://doi.org/10.1096/fj.08-112003>
- Oudhoff, M. J., Kroeze, K. L., Nazmi, K., van den Keijbus, P. A. M., van 't Hof, W., Fernandez-Borja, M., Hordijk, P. L., Gibbs, S., Bolscher, J. G. M., & Veerman, E. C. I. (2009). Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1000-fold. *The FASEB Journal*, 23, 3928–3935. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137588>
- Oydanich, M., Epstein, S. P., Gadaria-Rathod, N., Guers, J. J., Fernandez, K. B., & Asbell, P. A. (2018). In Vivo Efficacy of Histatin-1 in a Rabbit Animal Model. *Current Eye Research*, 43(10), 1215–1220. <https://doi.org/10.1080/02713683.2018.1490772>
- Peña-Oyarzun, D., Rodriguez-Peña, M., Burgos-Bravo, F., Vergara, A., Kretschmar, C., Sotomayor-Flores, C., Ramirez-Sarmiento, C. A., De Smedt, H., Reyes, M., Perez, W., Torres, V. A., Morselli, E., Altamirano, F., Wilson, C. A. M., Hill, J. A., Lavandero, S., & Criollo, A. (2021). PKD2/polycystin-2 induces autophagy by forming a complex with BECN1. *Autophagy*, 17(7), 1714–1728. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1782035>
- Pereira, R. F., & Bártolo, P. J. (2016). Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 5(5), 208–229. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0506>
- Petreaca, M. L., & Min Yao, Yan Liu, Kathryn DeFea, and M. M.-G. (2007). Transactivation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 by

- Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) Is Required for IL-8/CXCL8-induced Endothelial Permeability. *Molecular Biology of the Cell*, 18(December), 3250–3263. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>
- Sánchez, W. N., Robeson, L., Carrasco, V., Figueroa, N. L., Burgos-Bravo, F., Wilson, C. A. M., & Casanova-Morales, N. (2022). Determination of protein-protein interactions at the single-molecule level using optical tweezers. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 55(August). <https://doi.org/10.1017/S0033583522000075>
- Sarabipour, S., Ballmer-hofer, K., & Hristova, K. (2016). VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *ELife*, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.13876>
- Simons, M., Gordon, E., & Claesson-welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Publishing Group*, 17(10), 611–625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>
- Son, K. N., Lee, H., Shah, D., Kalmodia, S., Miller, R. C., Ali, M., Balasubramaniam, A., Cologna, S. M., Kong, H., Shukla, D., & Aakalu, V. K. (2021). Histatin-1 is an endogenous ligand of the sigma-2 receptor. *FEBS Journal*, 288(23), 6815–6827. <https://doi.org/10.1111/febs.16108>
- Sun, W., Ma, D., Bolscher, J. G. M., Nazmi, K., Veerman, E. C. I., Bikker, F. J., Sun, P., Lin, H., & Wu, G. (2020). Human Salivary Histatin-1 Promotes Osteogenic Cell Spreading on Both Bio-Inert Substrates and Titanium SLA Surfaces. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.584410>
- Tahergorabi, Z., & Khazaei, M. (2012). A review on angiogenesis and its assays. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(6), 1110–1126. <https://doi.org/10.3791/51766>
- Tanimoto, T., Jin, Z. G., & Berk, B. C. (2002). Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial

- nitric-oxide synthase (eNOS). *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42997–43001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204764200>
- Torres, P., Castro, M., Reyes, M., & Torres, V. A. (2018). Histatins, wound healing, and cell migration. *Oral Diseases*, 24(7), 1150–1160. <https://doi.org/10.1111/odi.12816>
- Torres, P., Díaz, J., Arce, M., Silva, P., Mendoza, P., Lois, P., Molina-Berríos, A., Owen, G. I., Palma, V., & Torres, V. A. (2017). The salivary peptide histatin-1 promotes endothelial cell adhesion, migration, and angiogenesis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1096/fj.201700085R>
- Torres, P., Jorge, D., Arce, M., Silva, P., Mendoza, P., Lois, P., Molina-berr, A., & Owen, G. I. (2017). The salivary peptide histatin-1 promotes endothelial cell adhesion, migration, and angiogenesis. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.201700085R>
- Trepat, X., Chen, Z., & Jacobson, K. (2012). Cell migration. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2369–2392. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110012>
- Turabelidze, A., Guo, S., Chung, A. Y., Chen, L., Dai, Y., Marucha, P. T., & Dipietro, L. A. (2014). *Intrinsic Differences between Oral and Skin Keratinocytes*. 9(9), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101480>
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. In *The Journal of International Medical Research* (Vol. 37, Issue 5).
- Velnar, T., & Gradisnik, L. (2018). Tissue Augmentation in Wound Healing: the Role of Endothelial and Epithelial Cells. *Medical Archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*, 72(6), 444–448. <https://doi.org/10.5455/medarh.2018.72.444-448>
- Waasdorp, M., Krom, B. P., Bikker, F. J., van Zuijlen, P. P. M., Niessen, F. B., & Gibbs, S. (2021). The bigger picture: Why oral mucosa heals better than skin. *Biomolecules*, 11(8), 1–22. <https://doi.org/10.3390/biom11081165>

- Wang, X., Bove, A. M., Simone, G., & Ma, B. (2020). Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(November), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.599281>
- Whittles, C. E., Pocock, T. M., Wedge, S. R., Kendrew, J., Hennequin, L. F., & Harper, S. J. (2002). ZM323881 , a Novel Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor-2. 1, 513–522. <https://doi.org/10.1038/sj.mn.7800164>
- Williams, M. C. (2014). Optical Tweezers: Measuring Piconewton Forces. *Physics*, 433(833). <https://doi.org/10.1021/ac00113a739>
- Woong Sik Jang, M. E. (2011). Salivary Histatins: Structure, Function, and Mechanisms of Antifungal Activity. In *アジア経済*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/9781555817176.ch13>
- Yamashita M., Niisato M., Kawaski Y., et al. (2022). VEGF-C/VEGFR-3 signalling in macrophages ameliorates acute lung injury. *Eur Respir J.* 2022 Apr. 14;59 (4). doi: 10.1183/13993003.00880-2021.
- Yihai Cao (2009). Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. 2009. *Angiogenesis*, Volume 2, 59
- Zhu, S., Yu, C., Zhao, M., Liu, N., Chen, Z. R., Liu, J., Li, G., Deng, Y., Sai, X., Huang, H., Guo, H., Chen, C., Wang, X., Zheng, Y., Sun, T., Chen, J., Zhuang, J., & Zhu, P. (2022). Histatin-1 loaded multifunctional, adhesive and conductive biomolecular hydrogel to treat diabetic wound. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209(December 2021), 1020–1031. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.214>
- Zheng, Y.; Yuan, W.; Liu, H.; Huang, S.; Bian, L.; Guo, R. (2020) Injectable supramolecular gelatin hydrogel loading of resveratrol and histatin-1 for burn wound therapy. *Biomater. Sci.* 2020, 8, 4810–4820.