

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTUDIO DEL MECANISMO DE LIBERACIÓN DE
ENDOGLINA SOLUBLE Y SU RELEVANCIA EN
HOMEOSTASIS VASCULAR**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ana Cristina Valbuena Díez

Bajo la dirección de los doctores

Carmelo Bernabéu Quirante,
Francisco Javier Blanco López

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR I**

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE
LIBERACIÓN DE ENDOGLINA SOLUBLE
Y SU RELEVANCIA EN HOMEOSTASIS
VASCULAR**

TESIS DOCTORAL

ANA CRISTINA VALBUENA DIEZ

Madrid, 2012

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 El endotelio. Características de las células endoteliales y función.....
- 1.2 La superfamilia del TGF- β y la fisiopatología vascular.....
- 1.3 Endoglina, un co-receptor de TGF- β
 - 1.3.1 Expresión y localización celular de endoglina.....
 - 1.3.2 Funciones de endoglina en el endotelio vascular.....
 - 1.3.3 Endoglina y la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria.....
 - 1.3.4 Endoglina soluble y su papel en la patología humana.....
- 1.4 Preeclampsia.....
 - 1.4.1 Fisiopatología de la preeclampsia.....
 - 1.4.2 Preeclampsia e hipoxia.....
 - 1.4.3 HIF-1 α como factor transcripcional mediador del estímulo hipóxico.....
 - 1.4.4 Predisposición genética.....
 - 1.4.5 Modelos celulares para estudiar la preeclampsia.....
- 1.5 El sistema oxisterol/LXR.....
 - 1.5.1 Los oxisteroles, ligandos fisiológicos de LXR.....
 - 1.5.2 LXR.....
- 1.6 Metaloproteasas y sus inhibidores endógenos.....

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- 3.1 Cultivos Celulares.....
- 3.2 Explantes placentarios humanos.....
- 3.3 Plásmidos y transfecciones celulares.....
- 3.4 Citometría de flujo.....
- 3.5 ELISA.....
- 3.6 Análisis de lípidos y preparación de liposomas.....
- 3.7 Análisis de los niveles de ARNm mediante PCR semicuantitativa y a tiempo real (RT-PCR).....
- 3.8 Experimentos de interferencia de ARN.....
- 3.9 Monitorización de la actividad metaloproteasa mediante un sustrato sintético fluorogénico.....
- 3.10 Péptidos bloqueantes y proteína recombinante.....
- 3.11 Experimentos in vivo y en ratón.....
- 3.12 Proteinuria.....
- 3.13 Estadística.....

4. RESULTADOS

- 4.1 La hipoxia induce la liberación de endoglina soluble.....
- 4.2 Los oxisteroles inducen la liberación de sEng a través de la vía de LXR.....
- 4.3 Los receptores LXR modulan el corte proteolítico de endoglina a través del inhibidor de MMP-3.....
- 4.4 MMP-14 está implicada en la liberación de endoglina soluble en células JAR.....
- 4.5 La activación de la vía de LXR in vivo aumenta los niveles de sEng y la presión arterial sistólica.....
- 4.6 El péptido de endoglina puede inhibir la liberación de sEng inducida por oxisteroles y la presión arterial.....

sistólica.....

- 5. DISCUSIÓN.....
- 6. CONCLUSIONES.....
- 7. BIBLIOGRAFÍA.....

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El endotelio. Características de las células endoteliales y función.

El endotelio es un tipo de epitelio plano simple que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos. Actualmente ha dejado de considerarse como mera barrera que intercambia nutrientes y desechos entre la sangre y los tejidos para pasar a ser considerado un órgano vital, ya que de su correcto funcionamiento depende la fisiología vascular. Su disfunción puede ser causa de diversas patologías, como la ceguera asociada a diabetes, artritis reumatoide, psoriasis, sepsis, síndrome urémico hemolítico, púrpura trombótica trombocitopénica, hipertensión, arterioesclerosis y trombosis (Goligorsky, 2000; Gresele y col., 2010; Hack y Zeerleder, 2001; Jones y col, 2001), además de contribuir al mal pronóstico del cáncer.

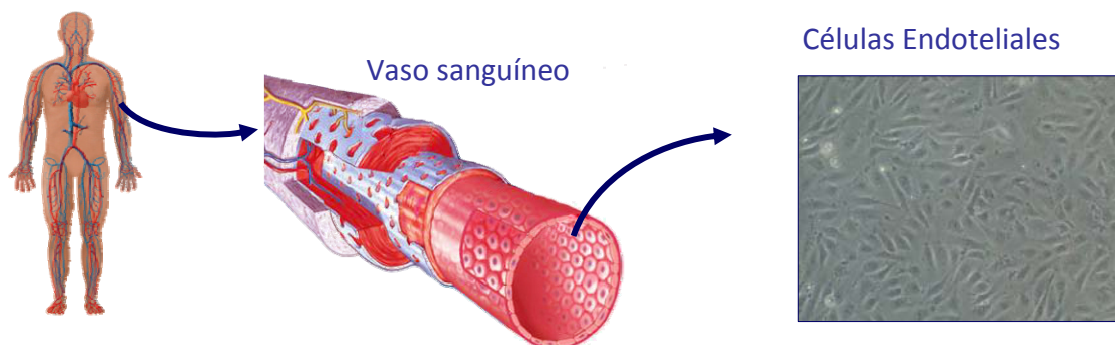


Figura 1. Representación esquemática del endotelio. Las observaciones clínicas, patológicas y experimentales de la fisiología vascular apoyan un papel fundamental de la célula endotelial en el mantenimiento de la homeostasis vascular y apuntan a su disfunción como base para el desarrollo de enfermedades.

La célula endotelial es el punto crítico en el que los diversos estímulos fisiológicos son integrados y transducidos, y participa activamente en la regulación de la permeabilidad selectiva, así como en la coagulación sanguínea y en el reclutamiento (*homing*) de las células inmunes a sitios específicos del organismo (Cleaver y Melton, 2003). Su fenotipo puede variar en respuesta a multitud de estímulos, como son el estrés de flujo laminar, que induce factores como la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) y la trombosmodulina, con propiedades antitrombóticas, antiadhesivas y antiinflamatorias (Bergh y col., 2009). De modo contrapuesto, citoquinas proinflamatorias, el flujo turbulento o los productos de glicosilación avanzada de pacientes diabéticos, pueden convertir el endotelio en disfuncional, al disminuirse la expresión de eNOS

(Wautier y Schmidt, 2004), aumentar los niveles del receptor VCAM-1 (*Vascular Cell-Adhesion Molecule 1*) y observarse un fenotipo procoagulante (Gimbrone y col., 2000).

1.2 La superfamilia del TGF- β y la fisiopatología vascular

El factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β) es el prototipo de una gran superfamilia de citoquinas conservadas a lo largo de la evolución. Hasta la fecha, más de sesenta miembros de la superfamilia han sido identificados en el genoma de múltiples organismos, y entre treinta y cuarenta se han hallado en el genoma humano. De entre los miembros que se han encontrado expresados como proteínas en humanos, se incluyen tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1, β 2, β 3), cinco activinas y al menos ocho proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) (Schmierer y Hill, 2007), además de inhibinas, hormona anti mülleriana (AMH, anti-Mullerian Hormone, también llamada MIS ó Sustancia Inhibidora Mülleriana), proteínas tipo nodales, miostatinas y proteínas osteogénicas (Massague y col., 2005; Roberts y Sporn, 1993). Todos ellos son polipéptidos que se sintetizan en la célula como precursores proteicos en forma dimérica y posteriormente son procesados por proteasas y secretados al medio extracelular para activar respuestas celulares durante procesos de crecimiento y diferenciación (ten Dijke y Arthur, 2007). Son importantes durante el desarrollo embrionario y, en el organismo adulto, regulan homeostasis tisular y están frecuentemente implicados en diversas condiciones patológicas (Goumans y Mummery, 2000; Piek y col., 1999).

La importancia vital que la señalización mediada por el TGF- β tiene en la biología endotelial se puso de manifiesto tras la identificación de diversas patologías vasculares causadas por la presencia de mutaciones en los genes de receptores de TGF- β (Gallione y col., 2004; Johnson y col., 1996; McAllister y col., 1994; Santibañez y col., 2011). Además, estudios sobre otras patologías cardiovasculares como el síndrome de Marfan y la preclampsia, desvelan la importancia de la regulación de la disponibilidad de isoformas activas de TGF- β en el medio extracelular. Mutaciones en las proteínas implicadas en la activación del propéptido, así como en proteínas de anclaje presentes en la matriz extracelular, dan lugar a estos y otros síndromes cardiovasculares (ten Dijke y Arthur, 2007; Santibañez y col., 2011). En paralelo a esas observaciones sobre la patología humana, los estudios genéticos en ratones han revelado el papel central que el TGF- β tiene durante la angiogénesis ya que, en ausencia de dichos receptores, la angiogénesis del saco vitelino no se produce con normalidad y se bloquea en estadios tempranos con fatales consecuencias para el embrión (Goumans y Mummery, 2000).

Los miembros de la superfamilia del TGF- β llevan a cabo sus acciones mediante la unión a un complejo receptor que consta de dos receptores (tipo I y tipo II) con actividad Ser/Thr-quinasa. Hay seis receptores tipo II (RII) y siete receptores tipo I (RI) descritos hasta la fecha en mamíferos (Schmierer y Hill, 2007; Santibañez y col., 2011). En el caso del TGF- β , el receptor tipo II es el T β RII y el receptor tipo I es T β RI/ALK5 (*Activin receptor-like kinase-5*). En las células endoteliales, el TGF- β puede señalizar, además de por ALK5, por ALK1, ya que ambos receptores tipo I se coexpresan en este tipo celular (Goumans y col., 2002; Oh y col., 2000).

El acceso del TGF- β a los receptores tipo I y II está regulado por su unión a proteínas solubles del medio extracelular y por la modulación llevada a cabo por los correceptores o receptores tipo III (T β RIII) accesorios, endoglina y betaglicano (ten Dijke y Arthur, 2007; ten Dijke y col., 2008; Bernabeu y col., 2009).

Cuando el TGF- β circulante se une al dímero de membrana T β RII (que está constitutivamente activado por auto-fosforilación en residuos Ser-Thr), el dímero T β RI es reclutado al complejo y fosforilado por T β RII en residuos Ser específicos en la región yuxtamembrana. A su vez, el correceptor (T β RIII, endoglina o betaglicano) se une a ellos y el complejo activo transduce la señal hacia el interior de la célula mediante las Smads (*Sma and Mad-related*). Las Smads reguladas por receptor (*R-Smads*) se encuentran en estado basal asociadas a la tubulina de los microtúbulos y en las cercanías de la membrana gracias a su interacción con ciertas proteínas de anclaje (Fig. 2). Existen proteínas que regulan negativamente la señalización de la vía. Las I-Smads, son inducidas por miembros de la propia superfamilia del TGF β , entre otros factores, e interaccionan con los receptores o compiten con las R-Smads por su unión con la Co-Smad. Se produce así un mecanismo de retroalimentación negativa de la propia ruta de señalización que sirve como mecanismo autorregulador (Figura 2). Otras proteínas, como las ubiquitín ligasas Smurf1 y 2, se unen a las R-Smads tras su salida del núcleo y las dirigen a la ruta de degradación del proteasoma (Zhu et al., 1999).

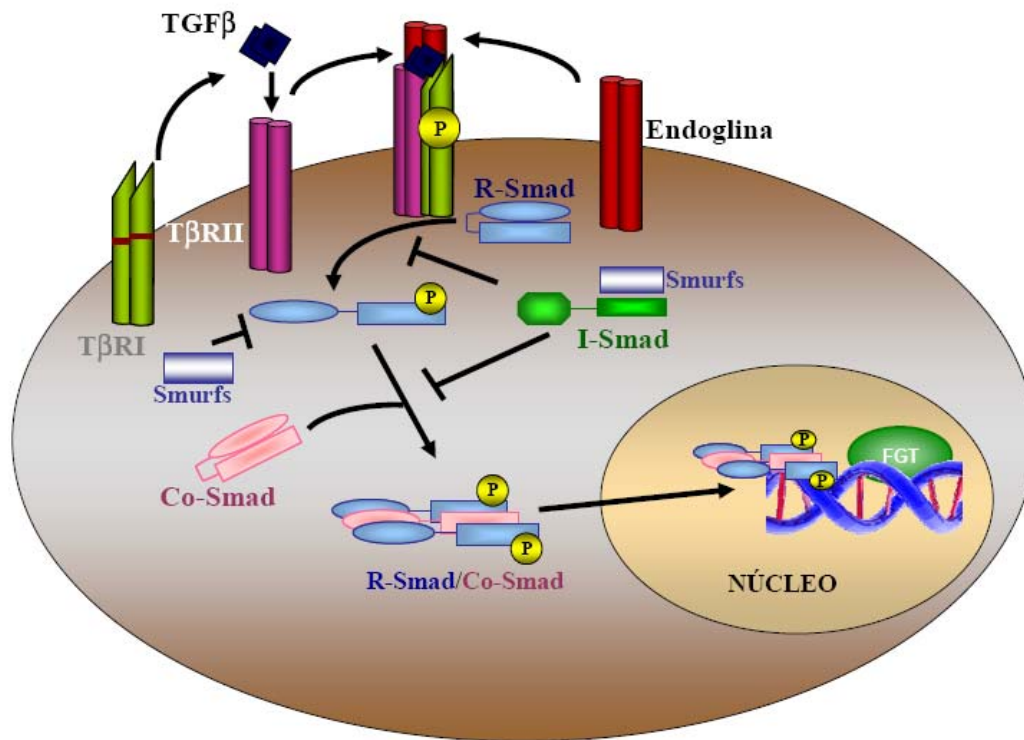


Figura 2. Ruta de señalización de TGF- β en la célula endotelial. La cascada de señalización comienza con la llegada del ligando, TGF- β , a la membrana de la célula endotelial. Se une al receptor tipo II que está constitutivamente fosforilado en residuos de Ser/Thr, recluta al receptor tipo I (ALK1) y lo fosforila activándolo. El complejo se une al co-receptor endoglina y el receptor tipo I fosforila a las Smads reguladoras, que heteromerizan entre sí para unirse a la Smad cooperadora Smad4. Esta asociación heterodimérica de proteínas Smad se transloca al núcleo donde se unen a sus elementos de respuesta diana modulando su transcripción. Los efectos implican proliferación celular, migración, degradación de matriz extracelular e invasión, de tal modo que favorecen la angiogénesis. Modificado de Fernandez-L y col., 2006.

1.3 Endoglina, un co-receptor de TGF- β

Una de las proteínas presentes en la membrana de la célula endotelial es endoglina, también conocida como CD105. Endoglina es una glicoproteína transmembrana de tipo I con una gran región extracelular y un pequeño tallo citoplásmico que se encuentra constitutivamente fosforilado (Gougos y Letarte, 1990; Lastres y col., 1994). A pesar de la ausencia de datos cristalográficos, se conocen bastante bien algunos detalles de la estructura de endoglina (Figura 3). Posee un peso molecular de 180 kDa, siendo sintetizada por la célula en forma de monómeros de 90 kDa, los cuales homodimerizan por puentes disulfuro en su región extracelular, la cual tiene un alto contenido en cisteínas. En su secuencia, los primeros 25 residuos constituyen un corto péptido señal (desde la metionina 1 hasta la alanina 25), rico en leucinas, que dirige a la

proteína a través del retículo endoplasmático y aparato de Golgi hasta la membrana plasmática donde finalmente es eliminado.

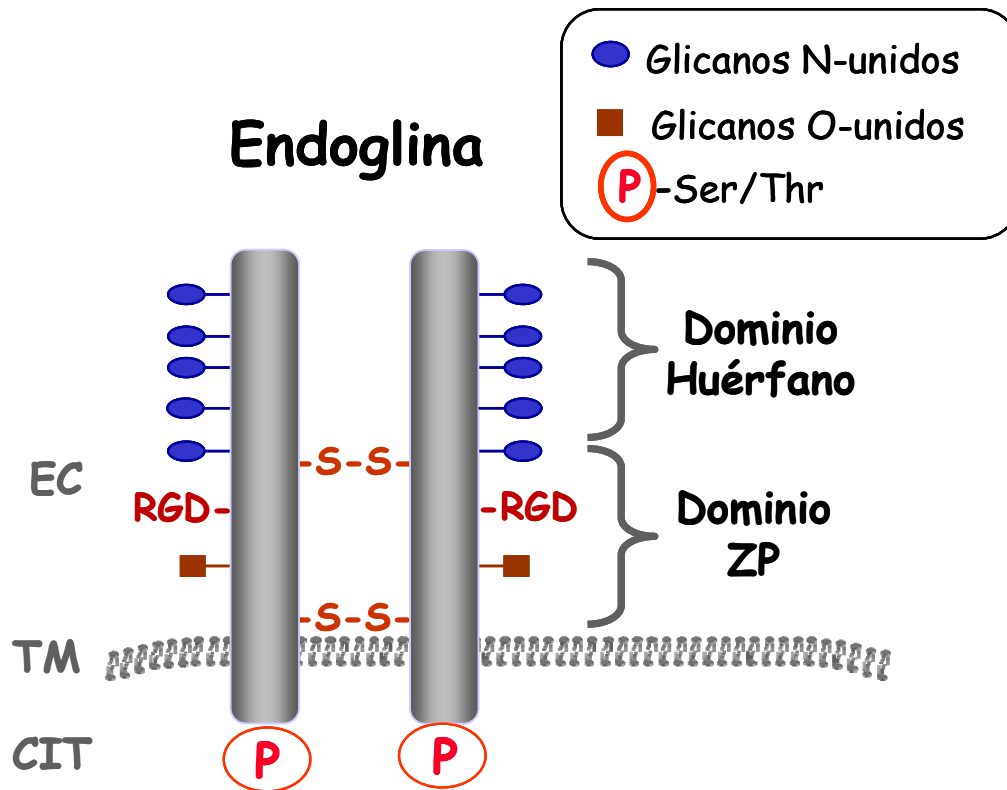


Figura 3. Representación esquemática del dímero de endoglina. EC, región extracelular; S-S, puente disulfuro; TM, secuencia transmembrana; CIT, tallo citoplásmico. RGD, triptéptido Arg399-Gly400-Asp401, implicado en adhesión celular; ZP, dominio estructural conservado denominado zona pelúcida, con 8 residuos de cisteína conservados, probablemente involucrado en interacciones proteína-proteína.

De los 561 aminoácidos que integran el dominio extracelular, destaca la presencia de un triptéptido Arg399-Gly400-Asp401 (RGD), posiblemente implicado en adhesión celular, y un dominio estructural conservado denominado zona pelúcida (ZP), probablemente involucrado en interacciones proteína-proteína. A continuación, hay una región transmembrana de 25 aminoácidos, rica en residuos hidrofóbicos, y un pequeño tallo citoplásmico que consta de 47 aminoácidos, rico en serinas y treoninas susceptibles de ser fosforiladas. En el extremo N terminal hay un gran dominio que contiene los residuos de aminoácidos Glu26-Ile359. Este fragmento no presenta ninguna homología significativa con las demás familias y dominios de proteínas, por lo que se le ha llamado dominio "huérfano" (Fig. 3).

Han sido identificadas dos variantes generadas por ajuste (*splicing*) alternativo. Así, se puede originar una isoforma minoritaria de endoglina, denominada endoglina-S, con la única diferencia frente a la isoforma mayoritaria (endoglina-L), de que el tallo citoplásmico consta tan sólo de 14 aminoácidos. Esta endoglina-S se origina por la aparición de un codón de parada prematuro en el marco de lectura como consecuencia de la no eliminación de un pequeño intrón de 135 nucleótidos entre los exones 13 y 14 (Fig. 4).

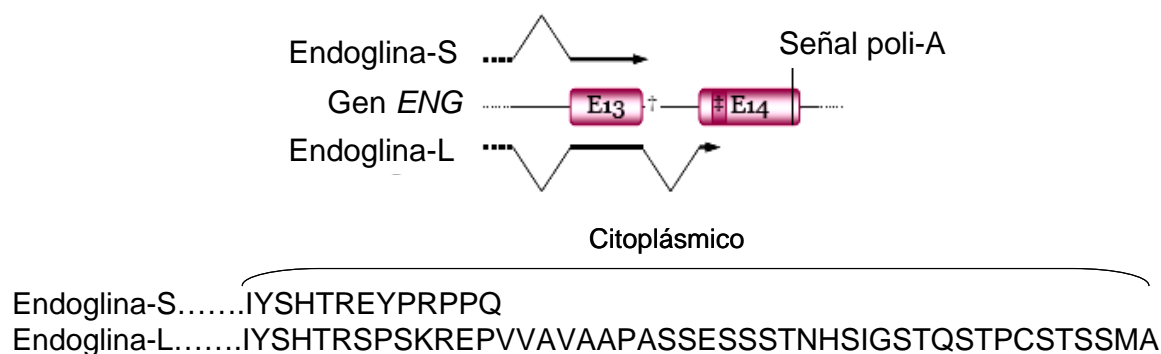


Figura 4. Ajuste alternativo en el RNA primario de endoglina. Si no se elimina el pequeño intrón de 135 pares de bases entre los exones E13 y E14 la traducción se detiene en el primer codón de parada (†), originándose la isoforma corta endoglina-S. En el caso de que sí se elimine, la traducción continúa hasta el segundo codón de parada en el exón E14 (‡), dando lugar a la isoforma larga endoglina-L. Ambos RNA maduros contienen la misma señal de poliadenilación en el extremo 3' de la secuencia. La secuencia de aminoácidos de ambas isoformas se detalla en la parte inferior.

Mientras que la función de la endoglina larga ha sido ampliamente documentada, el papel que desempeñaría esta isoforma corta de endoglina está aún poco estudiado (Bernabeu y col., 2007; Blanco y col., 2008). Endoglina posee oligosacáridos unidos a las cadenas polipeptídicas a través de enlaces N-Asn y O-Ser/Thr, que constituyen aproximadamente el 20% del peso total de la glicoproteína (Gougos y Letarte, 1988). El dominio citoplásmico de endoglina es rico en residuos de serina y treonina y se encuentra constitutivamente fosforilado por los receptores de TGF- β , aunque no se descarta la posible implicación de otras quinasas (Guerrero-Esteo y col., 2002).

1.3.1 Expresión y localización celular de endoglina

La expresión de endoglina es predominantemente endotelial, considerándose actualmente marcador específico de este linaje celular, en el que sus niveles de expresión son elevados, incrementándose en células que proliferan activamente en cultivo, en zonas de angiogénesis, en

regiones donde se ha producido daño en la pared vascular, en el endotelio de algunas patologías de la piel, en enfermedades autoinmunes y en el endotelio capilar angiogénico de carcinomas y angiosarcomas (Duff y col., 2003; Fonsatti y col., 2010; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). En relación con el sistema vascular, endogлина no sólo se expresa en la célula endotelial, sino también en otras células que participan en el mantenimiento de la estructura y función de los vasos sanguíneos como son los fibroblastos del estroma perivascular (Matsubara y col., 2000), células musculares lisas que rodean a los vasos, y sincitiotrofoblastos de placenta (Gougos y col., 1992; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010), siendo su expresión algo menor que en la célula endotelial, considerada la localización más específica de esta glicoproteína. Además, se ha descrito la expresión de endogлина en células de origen hematopoyético, como precursores de células B (Zhang y col., 1996), proeritroblastos (Buhning y col., 1991), macrófagos (Lastres y col., 1992; O'Connell y col., 1992) y células estromales de la médula ósea (St-Jacques y col., 1994; Rokhlin y col., 1995; Robledo y col., 1996). También se expresa en fibroblastos (St-Jacques y col., 1994; Raab y col., 1999; Guerrero-Esteo y col., 1999), células de músculo liso vascular (Adam y col., 1998), condrocitos del cartílago (Parker y col., 2003), células mesangiales de riñón (Rodríguez-Barbero y col., 2001; Diez-Marques y col., 2002), células estrelladas de hígado (Meurer y col., 2005) y también en ciertos tumores como melanoma (Altomonte y col., 1996; Bodey y col., 1998) o cáncer de próstata (Liu y col., 2002).

1.3.2 Funciones de endogлина en el endotelio vascular

Endogлина es un receptor auxiliar de TGF- β . Su capacidad para unir ligandos se estudió inicialmente mediante ensayos de afinidad y entrecruzamiento en células endoteliales, demostrándose que podía unir las isoformas 1 y 3 del TGF- β con alta afinidad, pero no unía la isoforma 2 (Cheifetz y col., 1992). Estudios posteriores demostraron que era capaz de interaccionar con los receptores señalizadores TGF- β R-II y TGF- β -RI (ALK-1 y ALK-5) unidos a TGF- β e incluso en ausencia de ligando (Lastres y col., 1996; Guerrero-Esteo y col., 2002; Bernabeu y col., 2007). Endogлина tiene en común con betaglicano (receptor tipo III de TGF- β), que es un receptor accesorio dentro del complejo receptor para ligandos de la superfamilia del TGF- β . Aunque endogлина no une el ligando TGF- β 1 por sí misma, sí lo hace por asociación con el receptor tipo II. Endogлина permite la unión de TGF- β 1 y TGF- β 3, pero no de TGF- β 2 por los receptores tipo II y tipo I (ALK-5 ubicuo y ALK-1 en endotelio). La cascada de señalización del sistema TGF- β , se esquematiza en la Fig. 2. Endogлина interacciona también con activina-A, y con BMP-7 y BMP-2, en presencia de sus receptores señalizadores, ALK-3 y ALK-6,

respectivamente, y es capaz de unir directamente BMP-9 y 10 (Cheifetz y col., 1992; Barbara y col., 1999; Scharpfenecker y col., 2007; Letamendia y col., 1998; Castonguay y col., 2011; Alt y col., 2012). Endoglina es capaz de inhibir algunas de las respuestas celulares a TGF- β mejor conocidas, como son la proliferación celular, el aumento en la producción de proteínas de la matriz extracelular y la inhibición de la migración y tubulogénesis de células endoteliales (Diez-Marques y col., 2002; Lastres y col., 1996). Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular subyacente en detalle. Se ha sugerido que endoglina podría modular las respuestas celulares a TGF- β mediante la interacción directa con los receptores señalizadores, si bien, no parece afectar a la formación de los complejos T β R-II/T β R-I (Barbara y col., 1999). Así, endoglina actuaría regulando o el acceso del ligando al complejo receptor, a nivel extracelular, o bien la actividad quinasa catalítica de los receptores señalizadores, por su interacción citoplásmica.

Otra de las funciones atribuidas a endoglina es su implicación en el control del tono vascular. Por un lado, se observó que los ratones heterocigotos para el gen de endoglina tenían una menor capacidad de respuesta al estímulo vasodilatador de acetilcolina o bradiquinina. Además, estos ratones, también denominados *Eng*^(+/-), tenían una menor cantidad de metabolitos del óxido nítrico en plasma y orina, debido a que los niveles de eNOS estaban también reducidos (Jerkic y col., 2004). También se ha demostrado que endoglina es capaz de asociarse con eNOS en unos microdominios de la membrana plasmática denominados caveolas, donde estabiliza el complejo con la proteína reguladora Hsp90, potenciadora de su actividad catalítica (Toporsian y col., 2005). Por otro lado, se ha estudiado el papel que endoglina juega en la organización del citoesqueleto celular. Como resultado de una búsqueda de ligandos para su región citoplásmica mediante el método del doble híbrido en levaduras, se obtuvo que esos 47 residuos citoplásmicos de endoglina eran capaces de interactuar con *Zyxin* y *ZRP-1* (*Zyxin-Related Protein-1*; o también *TRIP6*, *Thyroid Receptor Interacting Protein-6*), dos miembros de una familia de proteínas que regula la reorganización de actina y la movilidad celular. Así, endoglina es capaz de controlar la migración y la composición de las adhesiones focales por interactuar con *zyxin* y de organizar las fibras del citoesqueleto de F-actina, por medio de *ZRP-1* (Sanz-Rodriguez y col., 2004; Conley y col., 2004).

1.3.3 Endoglina y la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

Hace más de 100 años que se describió una patología vascular caracterizada por la presencia de telangiectasias (dilatación anormal de los vasos sanguíneos) y episodios de epistaxis (sangrados nasales) espontáneos y recurrentes denominada síndrome de Rendu-Osler-Webber, debido a que

fue descrita por tres diferentes autores, H. J. L. M. Rendu (1896), W. Osler (1901) y F. P. Webber (1907). También denominada actualmente Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT, *Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia*) (Fuchizaki y col., 2003; Hanes, 1909), se caracteriza además por sangrados gástricos y malformaciones arteriovenosas en hígado, cerebro y pulmón que dan lugar a la pérdida localizada de la red capilar, originando una conexión directa entre arterias y venas.

Actualmente es considerada como una enfermedad rara ya que su prevalencia es de 1:8.000 (Govani y Shovlin, 2009; Shovlin, 2010). El diagnóstico de esta patología se lleva a cabo teniendo en cuenta unos parámetros clínicos, denominados criterios de Curaçao (Shovlin y col., 2000; Faughnan y col., 2011). Además, existe el diagnóstico genético por secuenciación de DNA. En 1994 se reportó por primera vez que pacientes de HHT presentaban mutaciones en un locus localizado en la región 9q33-q34.1 del cromosoma 9, mediante estudios de ligación (McDonald y col., 1994; Shovlin y col., 1994). Independientemente, mediante la técnica de hibridación in situ, se demostró que el gen que codificaba endogлина (*ENG*) (Fernandez-Ruiz y col., 1993) mapeaba en esa misma región, lo que permitió demostrar que *ENG* era de hecho el gen de la HHT (McAllister y col., 1994). Se estableció así que mutaciones en el gen de endogлина son las responsables de la HHT tipo 1 (HHT1; OMIM 187300). No obstante, se vió que la HHT presentaba una heterogeneidad genética y que existían pacientes de HHT sin mutaciones en endogлина. Posteriormente, mediante ensayos de ligación genética, se describió un segundo locus para HHT que mapeaba en la región 12q11-q14, cromosoma 12, donde se localizaba el gen que codifica ALK-1 (*ACVRL1*) (Johnson y col., 1996). Así, se estableció el tipo 2 de HHT (HHT2; OMIM 600376). También se han descrito un tercer y cuarto locus situados en los cromosomas 5 (Cole y col., 2005) y 7 (Bayrak-Toydemir y col., 2006) que serían responsables de la HHT3 y HHT4 respectivamente, aunque los genes afectados aún se desconocen.

Los pacientes de HHT son heterocigotos para el gen afectado, proponiéndose un mecanismo de haploinsuficiencia como causa de la enfermedad (Figura 5). Así, estudios en ratones modificados genéticamente para eliminar completamente la expresión (*knock-out*) de endogлина o ALK-1 mueren a mitad de gestación (días 10,5-11,5) debido a defectos angiogénicos, evidentes en el saco vitelino, y cardiovasculares, en la formación de las válvulas del corazón (Arthur y col., 2000; Bourdeau y col., 1999; Li y col., 1999). Por lo tanto, al estar la proteína sana presente en un 50%, ya que es una enfermedad en heterocigosis, se propone un mecanismo de

haploinsuficiencia como causa de la enfermedad (Abdalla y Letarte, 2006). Esto quiere decir que la cantidad de proteína normal sintetizada no es suficiente para realizar las funciones celulares correctamente.

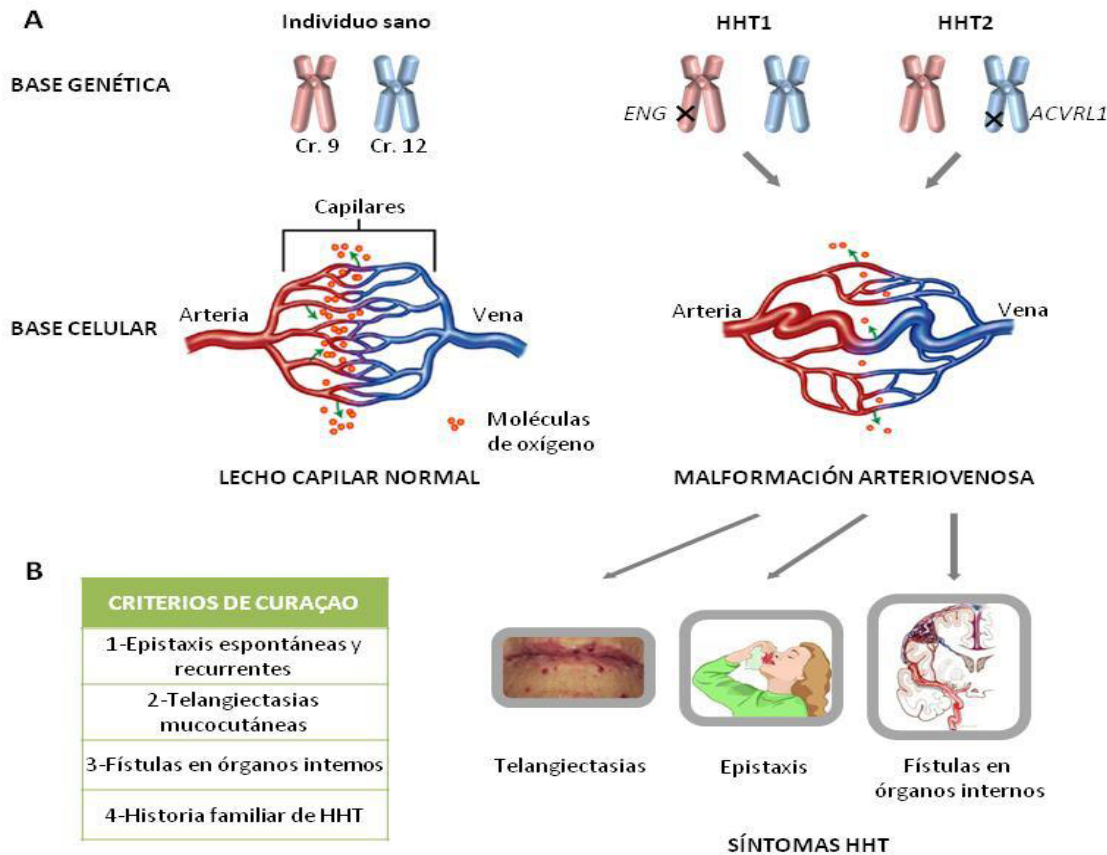


Figura 5. Bases moleculares y celulares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria y síntomas clínicos derivados. **A.** La HHT es una enfermedad vascular autosómica dominante que se caracteriza por hemorragias espontáneas y recurrentes. Mutaciones en los genes de ENG o ACVRL1 son en el 90% de los casos la base genética de la enfermedad. La haploinsuficiencia de una de estas dos proteínas es la hipótesis más aceptada sobre el mecanismo patogénico. En consecuencia, el balance de la señalización de TGF- β en endotelio se desregula, la pared vascular se vuelve frágil, su citoesqueleto se desestructura, y la angiogénesis se ve aumentada pero de modo descontrolado, dando vasos de morfología aberrante y calibre ensanchado, y perdiéndose la red capilar. **B.** La aparición de estas malformaciones arteriovenosas tiene como consecuencia un peor intercambio de oxígeno y nutrientes con los tejidos, da lugar a telangiectasias en piel y mucosas y a fístulas en órganos internos (fundamentalmente en cerebro, hígado, pulmón y tracto gastrointestinal). La rotura de estas frágiles estructuras da lugar a los síntomas, que incluyen sangrados nasales (epistaxis) por rotura debido a la abrasión de la membrana nasal, detección de telangiectasias y fístulas en órganos internos e historia familiar.

En todas las variantes de la enfermedad la base anatomopatológica es la misma: la disfuncionalidad de la señalización del TGF- β endotelial, que hace que el endotelio no se desarrolle con normalidad. Por lo tanto, todos los síntomas derivan de malformaciones arteriovenosas que dan lugar a la pérdida localizada de la red capilar, originando conexión directa entre arterias y venas (Abdalla y Letarte, 2006; Fernandez y col., 2006; Guttmacher y col., 1995; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010).

1.3.4 Endoglina soluble y su papel en la patología humana

Aparte de la endoglina anclada a la membrana celular, se ha detectado una forma soluble presente en el plasma sanguíneo, correspondiente a la región extracelular N-terminal de la proteína. Endoglina soluble está presente en niveles reducidos en la población normal, pero está aumentada en mujeres embarazadas que padecen preeclampsia, en función de la severidad de la misma (Venkatesha y col., 2006). Otros síndromes en los que aparecen niveles elevados de endoglina soluble son el cáncer de mama metastático, el cáncer de colon, cáncer de pulmón, así como la leucemia mieloide aguda (AML), la cardiomiopatía dilatada (CMD) y el infarto de miocardio (Cruz-Gonzalez y col., 2008; Li y col., 2000; Pérez-Gómez y col., 2007; Bernabeu y col., 2009; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010).

1.4 Preeclampsia.

La preeclampsia es un síndrome específico del embarazo que se caracteriza por hipertensión y proteinuria en el tercer trimestre del mismo. Afecta aproximadamente al 0,4%-2,8% de las embarazadas en países desarrollados, siendo el porcentaje mucho mayor en el caso de países en vías de desarrollo (Levine y col., 2006). La definición adecuada sería el diagnóstico de un embarazo con hipertensión asociada (presión diastólica > 90 mmHg) a partir de la semana 20 de gestación y con proteinuria (≥ 300 mg de proteína por día). Cuando los pacientes sufren disfunción del hígado, trombocitopenia y hemólisis se le denomina síndrome HELLP (*hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet*) (Roberts , 1998; Ballegeer y col., 1992). Aunque las definiciones se centran en los parámetros clínicos medidos, la preeclampsia se considera un desorden multisistémico que puede afectar al cerebro, pulmones, hígado y riñón.

1.4.1 Fisiopatología de la preeclampsia

El factor de inicio de la preeclampsia parece ser la reducción de la perfusión uteroplacentaria, secundaria a una anomalía en la invasión de las arterias espirales uterinas por las células

citotrofoblásticas extravilosas (CTEV), asociada a alteraciones locales del tono vascular (Figura 6), del balance inmunológico y del estado inflamatorio, algunas veces con predisposición genética (Verhaar y Rabelink, 2001). Otras características de la preeclampsia incluyen, la disfunción de la célula endotelial, dislipidemia (especialmente, hipertrigliceridemia), hiperinsulinemia, hiperleptinemia y desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes, entre otros (Fisher, 2004; Bowen y col., 2001; Burton y Jauniaux, 2004, Chamy y col., 2006). El endotelio, como responsable de un número de funciones fisiológicas vitales, está involucrado en la patogénesis de la preeclampsia (Verhaar y Rabelink, 2001). La preeclampsia es una enfermedad caracterizada por disfunción generalizada de la célula endotelial, relacionada con varios factores: ácidos grasos, lipoproteínas, peróxido lipídico, TNF- α , productos de degradación de fibronectina y fragmentos de microvellosidades de las células sincitiotrofoblásticas. Todos estos factores juntos provienen de una respuesta inflamatoria intravascular generalizada presente durante el embarazo, pero exacerbada en la preeclampsia (Merviela y col., 2004).

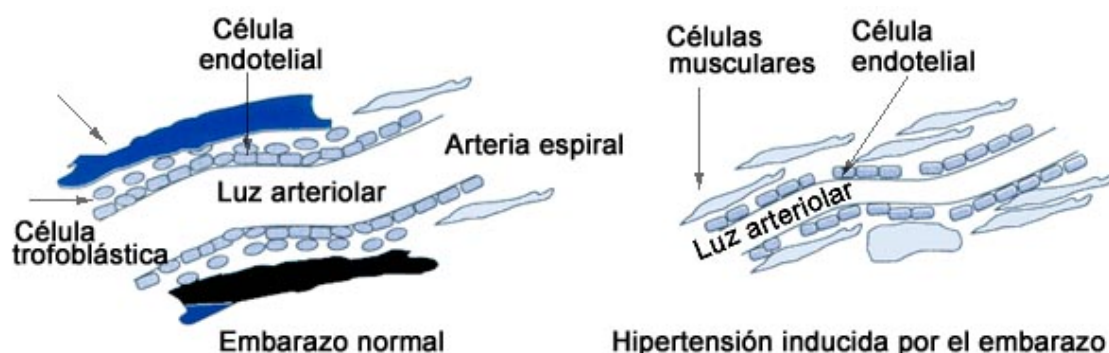


Figura 6. Invasión trofoblástica, en el embarazo normal (izquierda) y en la preeclampsia (derecha). Obsérvese el fallo en la invasión de las células trofoblásticas al endotelio, el mantenimiento de las células lisas musculares de las arterias espirales y la disminución de la luz arterial y del flujo sanguíneo, en la preeclampsia.

La decidua es la capa funcional del endometrio grávido y, como su nombre indica, se expulsa durante el parto. Son células voluminosas con abundante glucógeno y lípidos. Muchas de estas células deciduales se modifican en la región del sincitiotrofoblasto del blastocisto y junto con la sangre materna y secreciones uterinas proporcionan una rica fuente de nutrientes para el embrión. También protegen los tejidos maternos durante la invasión del sincitiotrofoblasto y participan en la producción hormonal. En la preeclampsia, la resistencia decidual, más poderosa

que la invasión trofoblástica, previene a las CTEV de alcanzar las arterias espirales. Las CTEV invasoras se diferencian anormalmente a sincitiotrofoblastos (células gigantes), que pierden su poder de penetración.

Se ha descrito que existe una mayor frecuencia de preeclampsia y de restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) en nulíparas (75% de los casos); esto puede asociarse con el hecho de que las arterias colonizadas en un primer embarazo pueden ser invadidas más fácilmente en embarazos subsiguientes. El papel de las células asesinas naturales (NK) deciduales puede explicar por qué se facilita una invasión subsiguiente. Además, se ha postulado la existencia de una memoria endometrial de los anticuerpos contra antígenos paternos. La preeclampsia ocurre de manera similar en nulíparas y multíparas que han cambiado de pareja (3,2 y 3%), pero es menor en multíparas con la misma pareja (1,9%). También se ha observado una mayor frecuencia de preeclampsia en embarazos en los que se produce donación de ovocitos, donación de espermatozoides o un largo periodo de anticoncepción (Walsh, 1985).

1.4.2 Preeclampsia e hipoxia

En la preeclampsia, la segunda invasión trofoblástica no ocurre o es incompleta, se produce vasoconstricción uterina, y el ingreso de sangre a los espacios intervelllosos es menor (Fig. 6). La consecuencia es la hipoxia, que provoca la presencia de niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS), con aumento de la peroxidación lipídica y de la relación tromboxano A₂/prostaciclina (TXA₂/PGI₂), lo cual acentúa la vasoconstricción y la agregación de plaquetas, condicionando la RCIU. Frecuentemente, en esta enfermedad se encuentra trombosis y depósitos de fibrina diseminados en la placenta. Además, la hipoxia o disminución de la presión de oxígeno (pO₂) también ocasiona el aumento de endotelina-1 (ET-1) y, en combinación con la disminución de la fuerza mecánica en la pared vascular, una disminución de NO en las arterias espirales del miometrio y la decidua. Esta disminución de NO parcialmente compensa el efecto estimulante de ET-1 en la liberación de NO (Jauniaux y col., 2000).

En mamíferos, el desarrollo de los sistemas cardiovascular, hematopoyético y respiratorio provee de un medio para capturar oxígeno del ambiente y distribuirlo a todas las células del organismo para ser utilizado como sustrato necesario en la fosforilación oxidativa y otras reacciones bioquímicas esenciales. Una situación de hipoxia puede provocar el fallo en la generación de suficiente ATP que mantenga las funciones celulares esenciales. Por lo tanto, las concentraciones celulares de oxígeno han de estar finamente reguladas en un rango fisiológico muy estrecho. La

concentración normal de O₂ a la que están expuestas las células es de aproximadamente un 20%. Si un tejido es sometido a una hipoxia crónica debido a una enfermedad genética o bien a una hipoxia aguda, generalmente producida por una isquemia, puede sufrir alteraciones muy graves que varían desde la atrofia hasta el infarto o la necrosis del tejido. Para evitarlo, el organismo dispone de sistemas que detectan el estímulo hipóxico generando una cascada de respuestas que tratan de restaurar la homeostasis tisular, adaptándose de este modo a la hipoxia, siempre que no sea extrema. Además, la hipoxia es un estímulo natural ante la necesidad de crear nuevos vasos, por ejemplo durante la gestación, y también es el mecanismo aprovechado por las células tumorales para crear vasos con los que nutrirse. Aunque las respuestas adaptativas a la hipoxia ocurren mediante diferentes mecanismos moleculares, un factor crítico en la regulación de la homeostasis de oxígeno tanto celular como sistémica durante la vida pre y postnatal es el factor de transcripción HIF-1 (Factor Inducible por la Hipoxia-1). Su función principal es la inducción transcripcional de una serie de genes implicados en angiogénesis, metabolismo del hierro, metabolismo de la glucosa, proliferación celular y supervivencia.

1.4.3 HIF-1 α como factor transcripcional mediador del estímulo hipóxico

La familia HIF es una familia de factores de transcripción que responde a cambios en la presión de oxígeno del entorno celular. HIF-1 es un heterodímero que consiste en una subunidad expresada constitutivamente, llamada HIF-1 β (de 91-94 kDa), y una subunidad que es la verdaderamente regulada por los niveles de oxígeno: HIF-1 α (o sus parálogos HIF-2 α ó HIF-3 α ; de 120-130 kDa) (Liu y col., 2012; Ke y Costa, 2006). Ambas subunidades pertenecen a la familia de proteínas de unión a ADN conocidas como bHLH-PAS (*basic Helix-Loop-Helix-Per/ARNT/Sim*) porque contienen dominios básicos hélice-bucle-hélice y dominios PAS (acrónimo referido a las proteínas PER/ARNT/SIM, en las que fue hallado dicho dominio por primera vez) (Wang y col., 1995). El dominio bHLH media la dimerización y las propiedades de unión al ADN mientras que el dominio PAS es un dominio adicional de dimerización. También posee un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) que es el que regula la estabilidad de la proteína (Pugh et al., 1997; Liu y col., 2012).

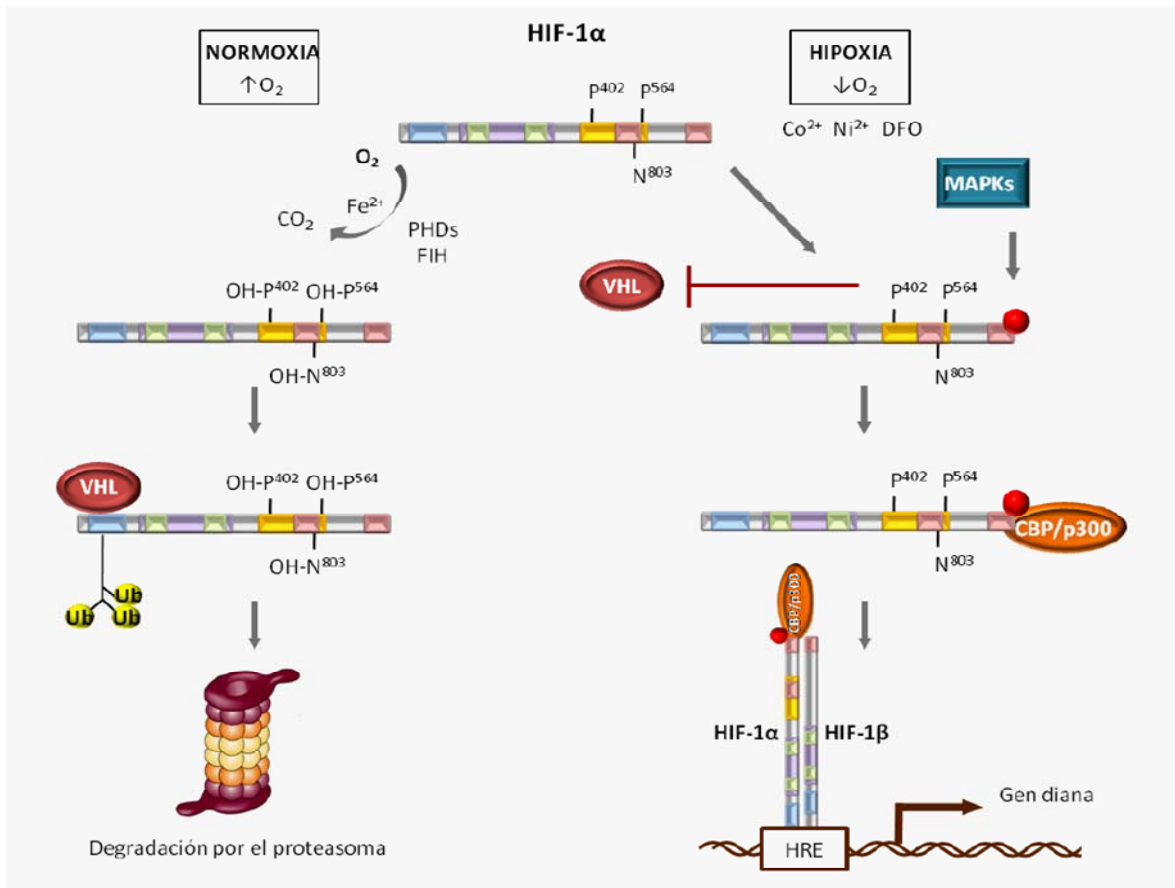


Figura 7. Mecanismo de regulación de la expresión de HIF-1 α en respuesta a hipoxia. En normoxia, las altas concentraciones de O₂ celular activan las prolil-hidroxilasas (PHDs) y sirven como sustrato para la hidroxilación de dos residuos de prolina de HIF-1 α (P402 y P564). Asimismo, una asparragina (N803) es hidroxilada por FIH (Factor inhibidor de HIF). Este proceso es dependiente de O₂, y también de oxoglutarato y Fe²⁺, que actúa como cofactor. Los residuos hidroxilados son reconocidos por una ubiquitin ligasa de tipo E3, el factor de von Hippel Landau (VHL), que marca a HIF-1 α con residuos de ubiquitina, lo que conlleva a la degradación de HIF-1 α por el proteasoma. La hipoxia celular inhibe este proceso, al carecer las PHDs de O₂ que les sirva de sustrato. Además, cualquier mecanismo que inhiba las PHD tendrá el mismo resultado que la hipoxia celular, al tener como consecuencia de la falta de degradación de HIF-1 α un aumento en sus concentraciones celulares. Es el caso de la presencia en el medio de quelantes de Fe²⁺, como la Deferroxamina (DFO) o de otros cationes que puedan desplazar su unión al centro activo de las PHD, bloqueándolas, como es el caso de Ni²⁺ y Co²⁺. Cuando la degradación se para y el número de moléculas de HIF-1 α se empieza a acumular en la célula, éste se une a la subunidad HIF-1 β y a otros coactivadores, reconociendo los promotores de genes diana en el ADN y uniéndose a ellos para modificarlos en función de las necesidades de la célula en respuesta a ese estímulo hipóxico. La fosforilación de HIF-1 α en su extremo carboxi-terminal por las quinasas dependientes de mitógenos (MAPKs) sirve para su reconocimiento y cooperación con el factor de transcripción CBP/p300.

HIF-1 α fue descubierto a raíz de la identificación de un elemento de respuesta a hipoxia (HRE) en el intensificador 3' del gen de la Eritropoyetina (Goldberg y col., 1988; Semenza y col., 1991; Wang y col., 1995). Trabajos posteriores fueron poniendo de manifiesto que HIF-1 α se expresa

de modo ubicuo en tejidos humanos y murinos y que su papel es fundamental en diversas respuestas fisiológicas a la hipoxia, como la eritropoyesis y la glicolisis, que son las principales armas para la rápida respuesta ante la deficiencia de oxígeno, y la angiogénesis, que constituye la respuesta a largo plazo (Semenza, 1998). Hoy en día se sabe que HIF-1 α es un factor dependiente de la secuencia de ADN, que reconoce sitios consenso de tipo 5'-RCGTG-3' (Mole y col., 2009; Semenza y col., 1996) y que aumenta la expresión de más de 60 genes en respuesta a una disponibilidad baja de oxígeno (Figura 7) (Manalo y col., 2005). De hecho, se ha descrito la existencia de un elemento de respuesta a hipoxia (HRE) en *ENG* (Sanchez-Elsner y col., 2002), mediante el cual la hipoxia es capaz de estimular la transcripción de endoglina.

1.4.4 Predisposición genética

No existe un único gen responsable de la preeclampsia, sino que probablemente hay un grupo de polimorfismos genéticos maternos que, cuando se asocian con factores ambientales, predisponen a la mujer a esta enfermedad. La hipótesis de transmisión recesiva de genes maternos parece la más probable (Liston y col., 1991). Además, los genes del feto también parecen contribuir al desarrollo de la preeclampsia. Por lo conocido hasta ahora, la preeclampsia parece ser una enfermedad hereditaria asociada a un gen materno recesivo y la manifestación de la enfermedad depende del padre. Las mujeres nacidas de embarazos complicados por preeclampsia tienen ellas mismas mayor riesgo de sufrir esta complicación. De manera similar, el riesgo de esta complicación para la mujer cuya pareja ha tenido un niño con otra mujer en un embarazo con preeclampsia es el doble que el riesgo de las mujeres sin historia familiar en ambas familias. Como tal, existe un claro rol paterno en la génesis de esta complicación (Esplin y col., 2001). Por ello, es muy probable que la preeclampsia involucre una huella genómica paterna de ciertos genes (Merviela y col., 2004).

1.4.5 Modelos celulares para estudiar la preeclampsia

La preeclampsia es una enfermedad temprana del embarazo, aunque se expresa tarde en el mismo (Merviela y col., 2004). Aún no existe una prueba clínicamente útil para predecir el desarrollo de la misma. Son promisorias las combinaciones de marcadores de insuficiencia placentaria y de función endotelial, y los niveles séricos o urinarios del factor de crecimiento derivado de la placenta (PIGF), de sFIT-1 (forma soluble del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial) y de endoglina soluble en el primer trimestre (Hagmann y col., 2012). Además, también es muy importante la historia clínica personal y familiar de hipertensión.

Además de su potencial uso como marcador de preeclampsia, la endoglina soluble parece jugar un papel patogénico, inhibiendo la formación de capilares *in vitro* e induciendo permeabilidad vascular e hipertensión *in vivo* (Venkatesha y col., 2006). Por otra parte, TGF- β 1 induce vasorrelajación a través de la activación de eNOS, pero endoglina soluble impide la unión de TGF- β 1 a sus receptores, interfiriendo así en dicha vía de señalización y en la activación de eNOS (Venkatesha y col., 2006). Sin embargo el/los mecanismos que dan lugar a los niveles aumentados de endoglina soluble en mujeres que sufren preeclampsia son desconocidos hoy en día, siendo el principal objeto de estudio de este trabajo.

Estudios inmunohistoquímicos revelan que el coriocarcinoma humano, neoplasia derivada de una invasión incontrolada de los trofoblastos a la decidua después de la implantación uterina, expresa intensamente endoglina en las regiones del tipo sincitiotrofoblasto, frente a la ausencia o débil expresión de la misma en citotrofoblastos (Letamendia y col., 1998). Este perfil de expresión de endoglina es similar al que se observa en el desarrollo normal de la placenta (Gougos y col., 1992). Por todo ello, en este trabajo, se eligió para estudiar el mecanismo de liberación de endoglina soluble, la línea de coriocarcinoma humano JAR (Letamendia y col., 1998).

1.5 El sistema oxisterol/LXR

1.5.1 Los oxisteroles, ligandos fisiológicos de LXR

El colesterol es un esteroide de origen animal que cumple numerosas funciones metabólicas: constituye la estructura básica para la formación de las hormonas esteroidales, a partir de él se forman las sales biliares, posee importantes funciones regulatorias en el metabolismo intracelular de los ácidos grasos, y es, junto con los fosfolípidos, uno de los componentes más importantes de las membranas celulares (citoplasmática, nuclear y de orgánulos) (Spector y col., 1985; Merrill y col., 1989; Morel y col., 1996). El colesterol, cuando es sometido a una oxidación, da origen a una serie de productos, de diferente estructura, aún no del todo definidos químicamente, que se identifican colectivamente con el nombre de oxisteroles (Maerker y col., 1987). Todos los oxisteroles comparten la estructura del colesterol con un oxígeno que contiene un grupo funcional como un alcohol, carbonilo o epoxido (Schroepfer, 2000). Existe una gran variedad de oxisteroles involucrados en diferentes enfermedades que varían en su origen. Los oxisteroles se forman cuando el colesterol es sometido al efecto directo o indirecto de la temperatura, irradiaciones, metales (bivalentes, principalmente), a agentes oxidantes como ROS, o algunas

enzimas. El oxígeno que contiene el grupo funcional se puede añadir al anillo del esteroide o la cadena lateral del colesterol mediante oxidación no-enzimática, oxidación enzimática o una combinación de ambos procesos (Figura 9).

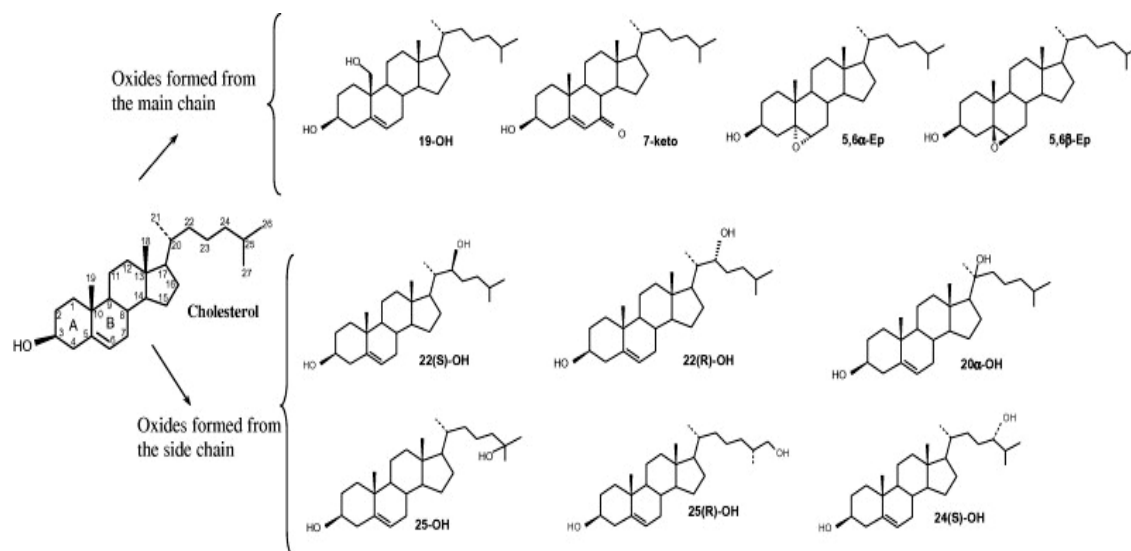


Figura 9. Los oxisteroles. Los oxisteroles son productos de oxidación del colesterol. El mecanismo de la oxidación no está del todo establecido, aunque se ha propuesto que los radicales libres formados en los grupos metilénicos de la cadena hidrocarbonada del ácido graso (o en los peroxiradicales derivados de la oxidación) serían iniciadores de la oxidación del colesterol.

Los oxisteroles están implicados en numerosos procesos biológicos, incluyendo, la homeostasis del colesterol, el metabolismo de los esfingolípidos, la agregación plaquetaria, la apoptosis y la prenilación de proteínas. Son moduladores del metabolismo del colesterol puesto que están implicados en la regulación de la síntesis del mismo y en la regulación de su eliminación a través de la síntesis de ácidos biliares. También están involucrados en la fisiopatología de la aterosclerosis, trombosis o hipercolesterolemia, entre otras enfermedades (Schroepfer, 2000; Steck y Lange, 2010). Se ha descrito que los oxisteroles inhiben la diferenciación y la fusión de las trofoblastos activando los LXRs (Aye y col., 2011). Además, en estudios *in vitro* se han observado efectos mutagénicos (Ansari y col., 1982) y procarcinogénicos de algunos oxisteroles (Kubow y col., 1992).

De todos los efectos atribuidos a los oxisteroles, quizás el que resulta más impactante o probablemente de mayor importancia, es el papel que éstos pueden tener en la aterogénesis (Schroepfer, 2000; Steck y Lange, 2010), especialmente a través de la inducción de la oxidación de las LDL. Estas LDL oxidadas se acumulan en el endotelio de los vasos sanguíneos

constituyendo uno de los componentes más importantes del ateroma. En modelos murinos, los agonistas de LXR han demostrado ser eficaces para el tratamiento de la arteriosclerosis, la diabetes, la inflamación y la enfermedad de Alzheimer (Scott, 2007). El agonista sintético GW3965 mejora la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina mediante la regulación de genes implicados en el metabolismo de la glucosa hepática y el tejido adiposo. Los agonistas T0901317, 22R-hidroxicolesterol y 24S-hidroxicolesterol también han demostrado suprimir la proliferación del cáncer de próstata y de mama, y en particular T0901317, disminuye la producción de la proteína beta amiloidea en modelos animales diseñados para el estudio de la enfermedad de Alzheimer (Scott, 2007).

1.5.2 LXR

Uno de los complejos mecanismos que controla la invasión del trofoblasto implica la activación de LXR (liver X receptors) por oxisteroles (Aye y col., 2011). Los LXRs son una subclase de receptores hormonales nucleares, que regulan la homeostasis lipídica en hígado, tejido adiposo y otros tejidos. Se han identificado dos isoformas funcionales, α (NR1H3) y β (NR1H2) (Repa y col., 2002). La primera es expresada mayoritariamente en el hígado y en menor medida en el intestino, tejido adiposo, riñón, bazo y macrófagos. LXR β , en cambio, se expresa en casi todos los tejidos del organismo (Baranowsky y col., 2008). Pese a su similitud, se piensa que ambas isoformas estarían involucradas en procesos biológicos distintos. Se ha descrito un gran número de ligandos naturales de LXR, como los derivados oxidados del colesterol denominados oxisteroles. En mamíferos, la principal fuente de oxisteroles proviene de la producción endógena. Una enzima muy importante en este proceso es la esterol 14 α -desmetilasa. Aunque dicha enzima se expresa en un gran número de tejidos, los niveles más elevados de la misma se observan en testículos, ovarios, próstata, hígado, riñón y pulmón. En el tracto reproductivo, están presentes muchos oxisteroles activadores, como el 22(R)-hidroxicolesterol.

Los LXR forman obligatoriamente heterodímeros con los receptores del retinoico (RXR) (Schultz y col., 2000; Edwards y col., 2002), un tipo de receptor nuclear que es activado por el ácido 9-cis-retinoico (RA). Se han descrito tres receptores diferentes de este tipo: receptor X retinoico α (RXRA), receptor X retinoico β (RXRB) y receptor X retinoico γ (RXRG). En ausencia de ligando, el heterodímero se une a secuencias localizadas en promotores de genes diana, junto con co-represores que bloquean la transcripción de los mismos (Janowski y col., 1999). La unión de un oxisterol o del ácido 9-cis-retinoico a sus respectivos receptores nucleares induce la liberación de los co-represores y refuerza las interacciones con co-activadores. Esta

cascada de eventos permite que se recluten proteínas que finalmente aumentan la expresión del gen diana y la consiguiente respuesta fisiológica de la célula (Figura 10).

Debido a la naturaleza lipídica de los ligandos, los roles fisiológicos de LXR han sido muy estudiados en la homeostasis del colesterol en intestino e hígado. Asimismo, los LXR también juegan un papel importante en homeostasis de la glucosa, inmunidad, desarrollo y homeostasis de la piel, funciones cerebrales y en la aterosclerosis.

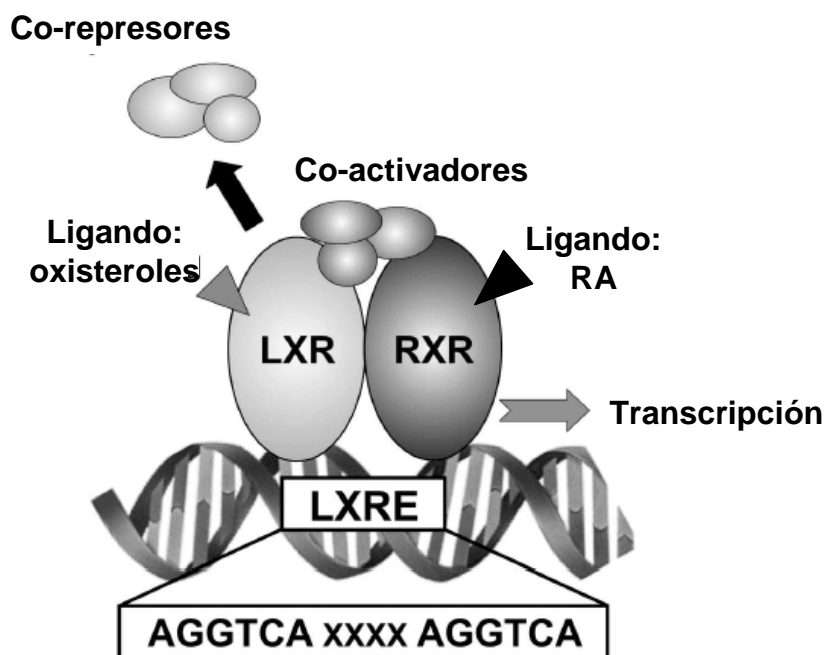


Figura 10. Mecanismo de la regulación transcripcional mediada por LXR. El heterodímero LXR/RXR se denomina “heterodímero permisivo” puesto que puede ser activado por ligandos de cualquiera de los miembros de la pareja de manera independiente. En ausencia de ligando, el heterodímero recluta complejos de co-represores y bloquea la transcripción. La unión de un oxisterol y/o del ácido 9-cis retinoico a sus respectivos receptores nucleares provoca el intercambio de co-represores por co-activadores e induce así la expresión del gen diana.

Se ha detectado la expresión de LXR α y β en líneas celulares derivadas de trofoblastos de placenta como JAR o BeWo, y tienen un papel regulador en trofoblastos de la placenta, lo que sugiere su implicación en preeclampsia (Marceau y col., 2005; Weedon-Fekjaer y col., 2005). Así, la activación de LXR β por oxisteroles conlleva una disminución de la invasión del trofoblasto, siendo el gen de endoglina una diana directa de LXR α . El tratamiento de células de coriocarcinoma humano, JAR con T0901317, un agonista sintético de LXR, induce un aumento significativo del RNA mensajero de endoglina y de la proteína. LXR es capaz de unirse al promotor de endoglina a través de elementos de respuesta a LXR, y de este modo, activar la

expresión génica de endoglina en células JAR (Henry-Berger y col., 2008). Todo esto sugiere un nuevo mecanismo, a través del cual se podría regular la invasión del trofoblasto en patologías del embarazo como la preclampsia.

1.6 Metaloproteasas y sus inhibidores endógenos

Las MMPs (*Matrix metalloproteinases*) conforman una familia de proteasas de zinc responsables de la ruptura de la matriz extracelular (ECM), estructuralmente relacionadas. En conjunto, estas MMPs son capaces *in vitro* e *in vivo* de degradar todo tipo de componentes de la matriz extracelular y por lo tanto, están implicadas en numerosos procesos de remodelado de tejidos (Bode y col., 1999). Las MMPs juegan un papel muy importante en numerosos procesos fisiológicos como desarrollo embrionario, morfogénesis de tejido, remodelación de tejido y hueso, angiogénesis y metástasis tumoral. Estos procesos dependen del corte por parte de las MMPs de receptores de superficie, proliferación y diferenciación celular y modulación de la actividad quimioquina (Stamenkovic y col., 2003). En la actualidad se han identificado 28 miembros de la familia de MMPs humanas, que pueden ser clasificadas en base a su especificidad de sustrato y estructura primaria, en el subgrupo de: colagenasas (MMP-1, -8 y -13), estromalisinas (MMP-3, -10, -11), MMPs asociadas a membrana (MT-MMPs: MMP-14, -15, -16, -17, -23, -24, -25) y otras nuevas MMPs (Brinckerhoff y col., 2000; Reno y col., 2005; López-Otín y col., 2009). Estas MMPs comparten una estructura multi-dominio común, pero están glicosiladas de manera diferente. Según los alineamientos de secuencia estos dominios podrían ser un evento evolutivo temprano, seguido de diversificación.

El poder degenerativo de las MMPs está controlado principalmente por los inhibidores endógenos de metaloproteasas (TIMPs, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*). La ruptura del equilibrio MMP/TIMP puede provocar la aparición de enfermedades como osteoartritis reumatoide, aterosclerosis, crecimiento tumoral, metástasis o fibrosis (Yoon y col., 2003). La inhibición terapéutica de las MMPs supone una aproximación prometedora para el tratamiento de algunas enfermedades, y la estructura de las MMPs y sus complejos con los TIMPs son dianas para un diseño inhibitorio con múltiples aplicaciones (Bode y col., 1999; Brew y Nagase, 2010).

Los TIMPs comprenden una familia de cuatro inhibidores, (TIMP-1, 2 3 y -4), cada uno de ellos con su propio perfil de inhibición de metaloproteasas, que cuando se superponen topológicamente muestran una homología de secuencia del 41 al 52% (Maskos y col., 2005). Los TIMPs inhiben las MMPs formando complejos no-covalentes 1:1, bloqueando de esta manera el

acceso de los sustratos al sitio catalítico de la MMP (Vasala y col., 2008). Además de la inhibición de las MMPs, los TIMPs tienen otras muchas funciones fisiológicas, como, activación de proMMPs, promoción del crecimiento celular, unión a matriz, inhibición de la angiogénesis, inducción de la apoptosis (Kang y col., 2008). El balance entre MMPs y sus inhibidores resulta esencial en muchas situaciones fisiológicas donde es requerida una rápida remodelación de la matriz extracelular, siendo alterado en algunas condiciones patológicas, como el cáncer (Egeblad y Werb, 2002). Por otra parte, otros estudios demuestran que los TIMPs son moléculas multipotenciales, cuyo papel no solo se limita a una inhibición enzimática de las MMPs, sino que también están involucradas en aspectos que pueden favorecer la progresión tumoral, tales como la inducción de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (Brand y col., 2000; Bond y col., 2000; Stetler-Stevenson, 2008).

2. OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto de la hipoxia en la liberación de endoglina soluble.
2. Estudiar la implicación de la vía de LXR en la producción de endoglina soluble.
3. Determinar si la liberación de endoglina soluble se produce por splicing alternativo o por el corte de una actividad proteolítica desconocida.
4. Estudiar el posible efecto modulador que pueden tener péptidos de endoglina en la liberación de la forma soluble.
5. Analizar el efecto de la liberación de niveles elevados de endoglina soluble en la presión sanguínea en modelos animales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Cultivos Celulares

La línea celular de coriocarcinoma humano JAR se cultivó en RPMI-1640 (Letamendia et al., 1998a). Los transfectantes estables de mioblastos de rata L6E9 (Letamendia et al., 1998b) y fibroblastos de ratón L929 (Bellon et al., 1993) que expresan endoglina humana se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) con 0.4 mg/ml de geneticina (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Las células humanas endoteliales de vena umbilical (HUVECs, Lonza, Walkersville, MD, USA) se cultivaron en medio EBM2 suplementado con EGM2 (Lonza). Los fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratón salvaje (WT) y ratón doble KO para LXR (*Lxr α , β '*) y las células de riñón de mono COS-7, se cultivaron en medio DMEM. Todos los medios se suplementaron con un 10% de suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina. Las células se cultivaron en una atmósfera al 5% CO₂ a 37°C. Para los estudios de activación de LXR, las células se incubaron durante 24 horas con 1-5 μ M del agonista sintético de LXR, T0901317 (Calbiochem), 5 μ M de 22(R)-hidroxicolesterol (22-R) y/o 10 μ M de ácido 9-cis-Retinoico (RA), ambos de Sigma-Aldrich (L'Isle D'Abeau, France). Para los ensayos de inhibición de metaloproteasas, las células se incubaron durante 24 horas con 10 μ g/ml de rhTIMP-1, rhTIMP -2 o rhTIMP-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 50 μ M de doxiciclina (Sigma-Aldrich) o 15 μ M de péptidos derivados de endoglina (descritos más adelante). Para los tratamientos de hipoxia, las células se incubaron en un incubador modular MIC-101 (Billups-Rothenberg Inc., CA) en presencia de 1% O₂ o 100 μ M de DFO (deferrioxamine mesylate salt; Sigma-Aldrich), con el que se consigue una hipoxia química, durante 24 horas. Para los ensayos de ELISA, las células fueron cultivadas en placas de 10 cm de diámetro. Estudios preliminares demostraron que este tamaño es el óptimo para conseguir una mayor concentración de sEng, minimizando así el error de detección con el kit de ELISA.

3.2 Explantes placentarios humanos

Se recogieron placentas frescas en un tiempo máximo de hasta 30 minutos después del parto en pacientes sin complicaciones. Se extirparon varios cotiledones al azar y se lavaron abundantemente con suero salino estéril para eliminar la sangre. La decidua y los vasos grandes fueron eliminados. Después de quitar el suero salino estéril se pesó el tejido y se pusieron 500 mg del mismo en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Los explantes se cultivaron durante 6

horas a 37°C con 2 ml de medio DMEM-F12 completo (Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau, France) suplementado con un 10% de FCS. A continuación se quitó el medio, se añadió medio nuevo y se incubaron los explantes durante 24 horas 5µM del oxisterol 22-R, como se indica. Para los ensayos de inhibición de las metaloproteasas, los explantes se incubaron durante 24 horas con 15µM de los péptidos de endoglina. El protocolo experimental está en acuerdo con la Declaración de Helsinki (2000) de la Asociación Medica Internacional, así como con los protocolos y guías de actuación aprobadas por el Comité Ético del Hospital de Salamanca, según la ley de protección de datos española 15/1999 y sus especificaciones de desarrollo y aplicación (RD 1720/2007). Cada paciente incluido en el estudio firmó un consentimiento autorizado para participar en la investigación después d recibir explicación detallada del mismo. Para garantizar la confidencialidad de los datos, todos los documentos del estudio se guardaron en lugar seguro, y solo los investigadores han tenido acceso a los mismos.

3.3 Plásmidos y transfecciones celulares

El vector de expresión que codifica endoglina humana marcada con el epítipo HA clonado en el plásmido pDisplay se describió por Guerrero-Esteo et al. (2002). El vector de expresión que codifica MMP-14 humana controlada por el promotor de citomegalovirus (CMV) en pCI-neo fue amablemente cedido por la Dra. Alicia Garcia-Arroyo (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid). Las transfecciones celulares se llevaron a cabo con el reactivo SuperFect Reagent (Qiagen, Crawley, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el día anterior a la transfección se plaquean 4×10^5 células en placas de 60mm de diámetro, y se cultivan durante 24 horas. El día de la transfección, se diluyen 5µg del ADN (disuelto en tampón TE: 10mM Tris-Cl, pH 7,5 y 1mM EDTA), en medio de cultivo sin suero, proteínas ni antibióticos, hasta un volumen total de 150µl. A continuación, se añaden 30µl del reactivo SuperFect, se mezcla bien y se incuba durante 5-10 minutos a temperatura ambiente; mientras, se lavan las células con 4ml de PBS. A continuación, se añade a la mezcla 1ml de medio de cultivo completo, se agita pipeteando un par de veces, y se añade todo el volumen a la placa que contiene las células lavadas. La muestra se incuba durante 2-3 horas en el incubador, se aspira el medio, se lava con 4ml de PBS y se añade medio fresco de cultivo completo. A las 24-48 horas se obtiene el máximo nivel de expresión del gen transfectado.

3.4 Citometría de flujo

Los análisis por citometría de flujo se realizaron con un aparato EPICS XL (Beckman Coulter). Las células creciendo en monocapa se lavaron con PBS y se recogieron mediante tratamiento con tripsina. Después, se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal de ratón anti-endoglina P4A4, monoclonal de conejo anti-MMP-14 (Abcam, Cambridge, UK; clon #EP1264Y) o con un anticuerpo monoclonal control durante 60 minutos a 4°C. Después de 2 lavados con PBS, se añadió un anticuerpo anti-ratón marcado con el fluorocromo Alexa 488 o anti-conejo marcado con Alexa 647 y se incubó durante otros 60 minutos a 4°C. Finalmente las células se lavaron 2 veces con PBS, se resuspendieron en una solución de 10µg/ml de yoduro de propidio para comprobar la viabilidad celular y se determinó la fluorescencia. Para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS), las células JAR se sometieron a hipoxia/normoxia durante 24 horas en presencia o ausencia de 1mM de Trolox (Calbiochem), un derivado soluble en agua de la vitamina E permeable a la célula y con propiedades antioxidantes. Después de 24 horas, se quitó el medio y las células se incubaron con 10µM de 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (CM-H2DCFDA; Invitrogen, Carlsbad, CA) y se mantuvieron a 37°C en oscuridad durante 60 minutos. A continuación, se lavaron 2 veces con PBS y se determinó la fluorescencia.

3.5 ELISA

Se utilizaron kits de ELISA comerciales para detectar sEng humana y de ratón, sFlt1 humana y de ratón, PlGF humana y de ratón y TIMP-3 humana. Las concentraciones de sEng humana en medio condicionado o plasma de ratones transgénicos de sEng humana se analizaron con el kit *Quantikine Human Endoglin/CD105* (R&D Systems, Minneapolis, MN). La sensibilidad del kit permite la detección de endoglina humana en un rango de 0,001 a 0,030 ng/mL. Las muestras de sangre de ratón se centrifugaron después de su recolección y se guardaron a -70°C hasta su análisis. Las concentraciones de sEng de ratón se analizaron mediante el kit *DuoSet Mouse Endoglin/CD105* (R&D Systems). La sensibilidad de dicho kit de ELISA permite la detección de una concentración mínima de endoglina de ratón de 0,05 ng/mL. Las concentraciones de sFlt1 humana en medio condicionado se analizaron con el kit *Quantikine ELISA Human sVEGF R1/Flt-1 Immunoassay* (R&D Systems, Minneapolis, MN). La sensibilidad del kit permite la detección de sFlt1 humana en un rango de 1.5 a 13.3 pg/mL. Las concentraciones de PlGF humana en medio condicionado se analizaron con el kit *Quantikine ELISA Human PlGF Immunoassay* (R&D Systems, Minneapolis, MN). La sensibilidad del kit permite la detección de

concentraciones de PlGF humana menores de 7 pg/mL. Las concentraciones de sFlt1 de ratón se analizaron mediante el kit *Mouse Soluble VEGF R1 Immunoassay*. La sensibilidad de dicho kit de ELISA permite la detección de una concentración mínima de sFlt1 de ratón de 3.8 - 15.2 pg/mL. Las concentraciones de PlGF de ratón se analizaron mediante el kit *Mouse PlGF Immunoassay*. La sensibilidad de dicho kit de ELISA permite la detección de una concentración mínima de PlGF de ratón de 1.14-1.84 pg/mL. Las muestras de sangre de ratón se centrifugaron después de su recolección y se guardaron a -70°C hasta su análisis. Las concentraciones de TIMP-3 en el medio condicionado se determinaron mediante el kit *TIMP-3 human ELISA* (Abnova, Taiwan). La sensibilidad de dicho kit permite la detección de una concentración mínima de TIMP-3 humana de 156 pg/mL. Todos los kits se basaron en el método ELISA tipo sándwich, y se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, tal como se indica a continuación:

•Kit *Quantikine Human Endoglin/CD105*:

1. El kit tiene una placa de 96 pocillos de poliestireno con un anticuerpo monoclonal anti-endoglina humana ya inmovilizado. Se añadieron 100µL por pocillo de tampón RD1S que contiene una base proteica y preservantes.
2. Se añadieron 50µL por pocillo de la proteína estándar (endoglina humana recombinante con la que se realiza una recta patrón mediante diluciones seriadas), o de la muestra a ensayar. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 500±50 rpm.
3. Se aspiró el contenido de cada pocillo y se realizó un lavado con un tampón que contiene surfactante; se repitió el proceso 4 veces.
4. Se añadieron 200µL por pocillo de una solución de anticuerpo monoclonal anti-endoglina humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubó durante otras 2 horas a temperatura ambiente en el agitador.
5. Se repitieron otros 4 ciclos de aspirado/lavado.
6. Se añadieron 200µL por pocillo de solución substrato conteniendo una mezcla 1:1 de peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz.
7. Se añadieron 50µL de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) y se determinó la densidad óptica en los 30 minutos siguientes, a 450nm empleando el equipo *Varioskan Flash spectral scanning multimode reader* (Thermo Scientific). Las concentraciones se determinaron mediante interpolación de la curva estándar, siguiendo las instrucciones del fabricante.

•Kit *DuoSet Mouse Endoglin/CD105* :

1. Se preparó la placa añadiendo 100µL por pocillo del anticuerpo de captura (anticuerpo de rata anti-endoglina de ratón diluido convenientemente en PBS). Se incubó la placa durante la noche a temperatura ambiente.
2. Se aspiró el contenido de cada pocillo y se lavó con tampón de lavado (0,05% de Tween 20 en PBS; pH 7,2-7,4) y se repitió el proceso 3 veces.
3. Se añadieron 300µL por pocillo de agente diluyente (1% de BSA en PBS; pH 7,2-7,4) y se incubó como mínimo una hora a temperatura ambiente.
4. Se repitió el proceso de aspirado/lavado.
5. Se añadieron 200µL por pocillo de muestra, control o estándar (endoglina de ratón recombinante reconstituida en agente diluyente, con la que se realiza un recta patrón mediante diluciones seriadas, también con agente diluyente) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Se repitió el proceso de aspiración/lavado.
7. Se añadieron 100µL por pocillo del anticuerpo de detección (anticuerpo de cabra biotinilado anti-endoglina de ratón) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
8. Se repitió el proceso de aspiración/lavado.
9. Se añadieron 100µL de estreptavidina conjugada con HRP por pocillo y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
10. Se repitió el proceso de aspiración/lavado.
11. Se añadieron 100µL por pocillo de solución substrato conteniendo una mezcla 1:1 de peróxido de hidrógeno y el cromógeno TMB. Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente evitando el contacto con la luz.
12. Se añadieron 50µL por pocillo de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) y se determinó la densidad óptica en los 30 minutos siguientes a 450nm empleando el equipo *Varioskan Flash spectral scanning multimode reader* (Thermo Scientific). Las concentraciones se determinaron mediante interpolación de la curva estándar.

•Kit *Quantikine ELISA Human sVEGF R1/Flt-1 Immunoassay*:

1. El kit tiene una placa de 96 pocillos de poliestireno con un anticuerpo monoclonal anti-VEGF R1 humana ya inmovilizado. Se añadieron 100 µL de diluyente RD1-68, que contiene una base proteica y preservantes, a cada pocillo.
2. Se añadieron 100µL por pocillo de la proteína estándar (VEGF R1 humano recombinante con la que se realiza una recta patrón mediante diluciones seriadas) o de la muestra a

ensayar. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 500 ± 50 rpm.

3. Se aspiró el contenido de cada pocillo y se realizó un lavado con un tampón que contiene surfactante; se repitió el proceso 4 veces.
4. Se añadieron $200\mu\text{L}$ por pocillo de una solución de anticuerpo policlonal anti-VEGF R1 humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubó durante otras 2 horas a temperatura ambiente en el agitador.
5. Se repitieron otros 4 ciclos de aspirado/lavado.
6. Se añadieron $200\mu\text{L}$ por pocillo de solución substrato conteniendo una mezcla 1:1 de peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz.
7. Se añadieron $50\mu\text{L}$ de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) y se determinó la densidad óptica en los 30 minutos siguientes, a 450nm empleando el equipo *Varioskan Flash spectral scanning multimode reader* (Thermo Scientific). Las concentraciones se determinaron mediante interpolación de la curva estándar, siguiendo las instrucciones del fabricante.

•Kit *Quantikine ELISA Human PIGF Immunoassay*:

1. El kit tiene una placa de 96 pocillos de poliestireno con un anticuerpo monoclonal anti-PIGF humana ya inmovilizado. Se añadieron $100\mu\text{L}$ de diluyente RD1-22, que contiene una base proteica y preservantes, a cada pocillo.
2. Se añadieron $100\mu\text{L}$ por pocillo de la proteína estándar (PIGF humana recombinante con la que se realiza una recta patrón mediante diluciones seriadas) o de la muestra a ensayar. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 500 ± 50 rpm.
3. Se aspiró el contenido de cada pocillo y se realizó un lavado con un tampón que contiene surfactante; se repitió el proceso 4 veces.
4. Se añadieron $200\mu\text{L}$ por pocillo de una solución de anticuerpo policlonal anti-PIGF humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en el agitador.
5. Se repitieron otros 4 ciclos de aspirado/lavado.
6. Se añadieron $200\mu\text{L}$ por pocillo de solución substrato conteniendo una mezcla 1:1 de peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz.

7. Se añadieron 50µL de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) y se determinó la densidad óptica en los 30 minutos siguientes, a 450nm empleando el equipo *Varioskan Flash spectral scanning multimode reader* (Thermo Scientific). Las concentraciones se determinaron mediante interpolación de la curva estándar, siguiendo las instrucciones del fabricante.

•*Kit Soluble VEGF R1 Immunoassay:*

1. El kit tiene una placa de 96 pocillos de poliestireno con un anticuerpo monoclonal anti-VEGF R1 de ratón ya inmovilizado. Se añadieron 100µL de diluyente RD1-21, que contiene una base proteica y preservantes, a cada pocillo.
2. Se añadieron 100µL por pocillo de la proteína estándar (VEGF R1 de ratón recombinante con la que se realiza una recta patrón mediante diluciones seriadas) o de la muestra a ensayar. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 500±50 rpm.
3. Se aspiró el contenido de cada pocillo y se realizó un lavado con un tampón que contiene surfactante; se repitió el proceso 4 veces.
4. Se añadieron 200µL por pocillo de una solución de anticuerpo policlonal anti-VEGF R1 de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en el agitador.
5. Se repitieron otros 4 ciclos de aspirado/lavado.
6. Se añadieron 200µL por pocillo de solución sustrato conteniendo una mezcla 1:1 de peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz.
7. Se añadieron 50µL de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) y se determinó la densidad óptica en los 30 minutos siguientes, a 450nm empleando el equipo *Varioskan Flash spectral scanning multimode reader* (Thermo Scientific). Las concentraciones se determinaron mediante interpolación de la curva estándar, siguiendo las instrucciones del fabricante.

•*Kit Mouse PlGF-2 Immunoassay:*

1. El kit tiene una placa de 96 pocillos de poliestireno con un anticuerpo monoclonal anti-PlGF de ratón ya inmovilizado. Se añadieron 100µL de diluyente RD1-47, que contiene una base proteica y preservantes, a cada pocillo.

2. Se añadieron 100µL por pocillo de la proteína estándar (PIGF de ratón recombinante con la que se realiza una recta patrón mediante diluciones seriadas) o de la muestra a ensayar. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 500±50 rpm.
3. Se aspiró el contenido de cada pocillo y se realizó un lavado con un tampón que contiene surfactante; se repitió el proceso 4 veces.
4. Se añadieron 200µL por pocillo de una solución de anticuerpo policlonal anti-PIGF de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en el agitador.
5. Se repitieron otros 4 ciclos de aspirado/lavado.
6. Se añadieron 200µL por pocillo de solución substrato conteniendo una mezcla 1:1 de peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz.
7. Se añadieron 50µL de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) y se determinó la densidad óptica en los 30 minutos siguientes, a 450nm empleando el equipo *Varioskan Flash spectral scanning multimode reader* (Thermo Scientific). Las concentraciones se determinaron mediante interpolación de la curva estándar, siguiendo las instrucciones del fabricante.

•Kit *TIMP-3 human ELISA* :

1. El kit tiene una placa de 96 pocillos de poliestireno con un anticuerpo anti-TIMP-3 humana ya inmovilizado. Se añadieron 100µL por pocillo del estándar (TIMP-3 humana recombinante con la que se realiza una recta patrón mediante diluciones seriadas), control o muestra, y se incubó a 37°C durante 90 minutos.
2. Se aspiró el contenido de cada pocillo.
3. Se añadieron 100µL por pocillo de anticuerpo anti-TIMP-3 humana biotinilado y se incubó a 37°C durante 1 hora.
4. Se aspiró y lavó cada pocillo 3 veces con 0,01M de PBS.
5. Se añadieron 100µL por pocillo de solución de trabajo (solución de un complejo avidina-biotina-peroxidasa) y se incubó a 37°C durante 30 minutos.
6. Se aspiró y lavó cada pocillo 5 veces con 0,01M PBS.
7. Se añadieron 90µL por pocillo de una solución del cromógeno TMB y se incubó a 37°C durante 15-20 minutos.

8. Se añadieron 100µL por pocillo de solución de parada y se determinó la densidad óptica en los 30 minutos siguientes a 450nm empleando el equipo *Varioskan Flash spectral scanning multimode reader* (Thermo Scientific). Las concentraciones se determinaron mediante interpolación de la curva estándar siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6 Análisis de lípidos y preparación de liposomas

La extracción lipídica se realizó siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959). En resumen, las células JAR adherentes se levantaron mediante rascado y se resuspendieron en PBS. A continuación, 0,8 volúmenes de homogenado celular acuoso se mezclaron vigorosamente con 3 volúmenes de una mezcla 1:2 (v/v) cloroformo /metanol y la muestra se mantuvo durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Después, la muestra se mezcló con 1 volumen de una mezcla 1:1 (v/v) cloroformo/agua, se agitó y se centrifugó a alta velocidad (3.000 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta que se formó un sistema de dos fases. La fase que contiene cloroformo (que se encuentra en la parte de abajo), y que contiene los lípidos, se aisló y sometió a análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Antes de su análisis por GC-MS, los lípidos se derivatizaron a éteres de trimetilsilil (TMS) con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). Para ello, la muestra se transfirió a un vial de GC y se mezcló con 25 µL de BSTFA y 25 µL de piridina. El vial se tapó adecuadamente y se calentó a 60°C durante ~45 minutos. La muestra se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente y se inyectó en el equipo de GC-MS (Agilent 7890A, Agilent Technologies). Como control para la GC-MS, se emplearon colesterol y 22-R-hidroxicolesterol (Sigma-Aldrich).

Los liposomas conteniendo L- α -fosfatidilcolina (Sigma-Aldrich) y 22-R se prepararon a una concentración molar de 2:1, respectivamente. Los lípidos se disolvieron en cloroformo, se mezclaron vigorosamente en un tubo cónico y se desecaron al vacío. El residuo viscoso resultante se resuspendió en PBS (pH 7,4). Cuando fue necesario se añadieron los péptidos de endoglina a la mezcla. La suspensión acuosa resultante se sometió a sonicación durante 1 hora antes de inyectarla a los ratones.

3.7 Análisis de los niveles de ARNm mediante PCR semicuantitativa y a tiempo real (RT-PCR)

El ARN total se aisló de las células con el kit *RNeasy* (Qiagen) y se sometió a transcripción reversa utilizando el kit *iScript DNAc Synthesis* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Para los análisis cuantitativos, el DNAc resultante se empleó como muestra para la PCR a tiempo real utilizando el reactivo *iQ SyBR-Green Supermix* (Bio-Rad). Los oligos utilizados para amplificar TIMP-3 humano fueron: 5'-AGCTTCCGAGAGTCTCTGTG-3' (Directo) y 5'-CACCTCTCCACGAAGTTGC-3' (Reverso). Los oligos empleados para amplificar TIMP-2 humano fueron: 5'-CCAAGCAGGAGTTTCTCGAC-3' (Directo) y 5'-TTTCCAGGAAGGGATGTCAG-3' (Reverso). Los oligos empleados para amplificar HIF-1 α humano fueron: 5'-TGATGACCAGCAACTTGAGG-3' (Directo) y 5'-TTGATTGAGTGCAGGGTCAG-3' (Reverso). Los amplicones fueron detectados utilizando el sistema de detección *iQ5 real time* (Bio-Rad). Los niveles de los transcritos se normalizaron con los niveles de 18S. Se realizaron triplicados de cada experimento.

Para la RT-PCR semicuantitativa, el ADNc se sometió a amplificación por PCR empleando el kit *HotMaster Taq DNA Polymerase* (5 Prime Inc., Gaithersburg, MD) utilizando los oligos para TIMP-3 humano descritos anteriormente y, como control, se emplearon oligos para gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH): 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' (Directo) y 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3' (Reverso). Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Los geles se documentaron con un aparato Gel Doc XR System (Bio-Rad) y las bandas se cuantificaron utilizando el software Quantity One.

3.8 Experimentos de interferencia de ARN

Los ácidos ribonucleicos interferentes pequeños (siRNA) para TIMP-3 y HIF-1 α humanos se obtuvieron de Ambion Inc. (Austin, USA; ref.# AM16708A). Se emplearon 3 siRNA diferentes para HIF-1 α (144736, 106499 y 3187) y TIMP-3 (s14146, s14148 y s14147) y un siRNA de secuencia al azar como control. Las células JAR se transfectaron con 5 pmoles del siRNA específico o control, empleando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Los análisis cuantitativos de los transcritos de HIF-1 α y TIMP-3 se realizaron como se describió en el apartado anterior.

3.9 Monitorización de la actividad metaloproteasa mediante un sustrato sintético fluorogénico

Para activar las metaloproteasas, las células JAR o los explantes placentarios humanos, se cultivaron en una placa de 96 o de 6 pocillos, respectivamente, en presencia o ausencia de 5 μ M de T09, 5 μ M de 22-R, 10 μ M de RA o 50 μ M de doxiciclina durante 24 horas. A continuación, se

eliminó el medio y se añadió una mezcla de 100µl de tampón TNC (50 mM Tris, 0,15M NaCl, 10 mM CaCl₂ y 0,002% NaN₃; pH 7,5) y 100µl de 3µM de péptido fluorogénico Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂ (R&D Systems, Minneapolis, MN) por pocillo. Después de una incubación de una hora a 37°C, se añadieron 20µl por pocillo de solución de parada 10X (100 nM EDTA y 0,02% NaN₃; pH 7,5). Las muestras se transfirieron a una placa negra de 96 pocillos y la fluorescencia se determinó utilizando una longitud de onda de excitación de 325 nm y de emisión de 393 nm, según las instrucciones del fabricante, en un aparato *Varioskan Flash spectral scanning multimode reader* (Thermo Scientific). Para los ensayos sin células, se activó MMP-14 recombinante humana, que contiene el prodominio y los dominios catalítico y hemopexina (Millipore), incubándola con 1mM de APMA (4-Aminophenylmercuric acetate; Sigma-Aldrich) durante 2-3 horas a 37°C. Una mezcla de 10µl de 200nM de MMP-14 y 90 µl de tampón TNC se añadió a cada pocillo de una placa negra de 96 pocillos. Después de 10 minutos a 37°C, se añadieron 100µl de 3µM de Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂. Una vez incubadas las muestras durante una hora a 37°C, se añadieron 20µl de solución de parada 10X y se determinó la fluorescencia como se describió anteriormente. Cuando fue necesario, la actividad de la metaloproteasa se determinó en presencia de 30µM de péptidos bloqueantes de endoglina o 50µM de doxiciclina.

3.10 Péptidos bloqueantes y proteína recombinante

Los péptidos se diseñaron a partir de regiones evolutivamente conservadas de la secuencia de endoglina con acetilación en N-terminal y amidación en C-terminal, se sintetizaron y purificaron hasta una pureza >90% (Biomedal SL, Sevilla). Los péptidos P583 (TSKGLVLP), P447 (SLSFQLGLYL) y P230 (GPRTVTVK), corresponden a las posiciones de endoglina humana 583-590, 447-456 y 230-237, respectivamente, y se disolvieron en agua destilada. La endoglina humana recombinante que corresponde al dominio extracelular (Glu26-Gly586) se obtuvo de R&D Systems.

3.11 Experimentos in vivo y en ratón

Los ratones C57BL/6J (machos de 8-12 semanas de edad) son de origen comercial (*The Jackson Laboratory*, Bar Harbor, ME, USA). A un grupo de cuatro ratones se les inyectó intraperitonealmente T09 (40-50mg/kg), o el vehículo correspondiente (etanol-solución salina 1:1) diariamente durante 4-6 días. Los tratamientos más prolongados en el tiempo resultan tóxicos para los animales por efecto del disolvente (etanol). Alternativamente, a los ratones se les inyectó intravenosamente en la vena de la cola una mezcla de liposomas que contiene 22-R (40-

50mg/kg) y L- α -fosfatidilcolina a un relación molar de 1:2, respectivamente, diariamente durante 4-6 días. La mezcla de liposomas inyectada también contiene 60 μ g/g peso ratón/día de péptidos, según se indica. A un grupo de cuatro hembras preñadas (20 semanas de edad, 3^a semana de gestación) se les inyectó liposomas como se indica. La presión arterial sistólica (PAS) se midió diariamente con un esfigmomanómetro de cola (NIPREM 546). Alternativamente, se midió la presión arterial sistólica, diastólica y media por radiotelemedría, empleando un catéter implantado en una arteria del animal que va unido a un transductor de señal de presión, un transmisor y una batería, todo ello encapsulado en un monitor electrónico implantable (PA-C20, Data Sciences International, DSI; St. Paul, MN, USA). Cada animal se mantuvo de forma individual en una jaula de polipropileno estándar en ciclos de luz-oscuridad de 12:12-h, se alimentaron de forma estándar con pienso para roedores y se les administró agua potable *ad libitum*. Como mínimo 3 días después de la recuperación, la jaula se colocó encima de un receptor de radio y se realizaron medidas en cada animal entre las 10:00 a.m. y las 14:00 p.m., durante al menos 10 días para asegurarse de que se están tomando datos estables. Dichos datos se recuperaron mediante el software proporcionado por Data Sciences. Al finalizar el tratamiento, los ratones fueron sacrificados, se extrajo el plasma y se determinaron los niveles de sEng de ratón mediante el kit de ELISA descrito anteriormente. La generación y caracterización de los ratones C57BL/6J que expresan constitutivamente altos niveles de sEng humana (sol.Eng⁺ mice) se describirá por el grupo del Dr. López-Novoa (Universidad de Salamanca). En estos animales y sus compañeros salvajes (WT), se extrajo plasma de un corte en la cola y se determinaron los niveles de sEng humana mediante ELISA. La generación y caracterización de los ratones Ola129/C57BL/6J knock-in que tienen MMP-14 endógena sobreexpresada de una manera dependiente de tetraciclina será descrita por la Dra. Llano y colaboradores (Centro de Investigación del Cáncer, CIC, Universidad de Salamanca). La sobreexpresión de MMP-14 se indujo cuando los ratones tenían 5 semanas de edad. Todos los procedimientos fueron aprobados por los Comités de Uso y Cuidado Animal de la Universidad de Salamanca y los ratones se cuidaron según los estándares de los Institutos Nacionales de Salud, Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio.

3.12 Proteinuria

Se recolectó la orina de las últimas 24 horas de tratamiento de los ratones machos a los que se les había inyectado intravenosamente en la vena de la cola una mezcla de liposomas que contiene 22-R (40-50mg/kg) y L- α -fosfatidilcolina a un relación molar de 1:2, respectivamente, y a los ratones control, a los que se les había inyectado liposomas que contienen sólo L- α -

fosfatidilcolina. La concentración total de proteína en la orina de dichos ratones se midió mediante el método colorimétrico de Bradford.

3.13 Estadística

Los datos se sometieron a análisis estadístico y los resultados se presentaron como promedio \pm SEM. Las diferencias entre los valores promedios se analizaron mediante el test de t de Student. En las figuras la significación estadística se señala mediante asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ns = no significativo). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA (GraphPad Software) y se corrigieron en el caso de medidas repetidas cuando fue necesario. En el caso de que el ANOVA revelara diferencias significativas, los promedios individuales se evaluaron utilizando el procedimiento Bonferroni. En las figuras la significación estadística se señala mediante almohadillas (# $p < 0.05$; ## $p < 0.0001$).

RESULTADOS

4.1 La hipoxia induce la liberación de endoglina soluble

Se ha descrito que la hipoxia es clave en el desarrollo de la preeclampsia (Soleymanlou y col., 2005; Al-Gubory y col., 2010) y el aumento de los niveles de sEng es un marcador de la evolución de esta patología (Ventakatesha y col., 2006). Por ello, se decidió comprobar si la hipoxia está implicada en la liberación de sEng. Para ello, las células JAR se incubaron con 1% de oxígeno en el incubador modular MIC-101 o bien se trataron con desferroxiamina (DFO) durante 24 horas. A continuación, se recogió el medio condicionado y se analizaron los niveles de sEng mediante ELISA. Como se muestra en la Fig. 10A, ambos tipos de estímulos hipóxicos indujeron significativamente la liberación de sEng al medio. Por otro lado, se sometieron a hipoxia dos tipos de transfectantes estables (mioblastos de rata y fibroblastos de ratón) que expresan endoglina humana y al analizar por ELISA los sobrenadantes después de 24 horas en el incubador modular MIC-101 se observó que los niveles de sEng también aumentan en los sobrenadantes de los transfectantes estables (Fig. 10B).

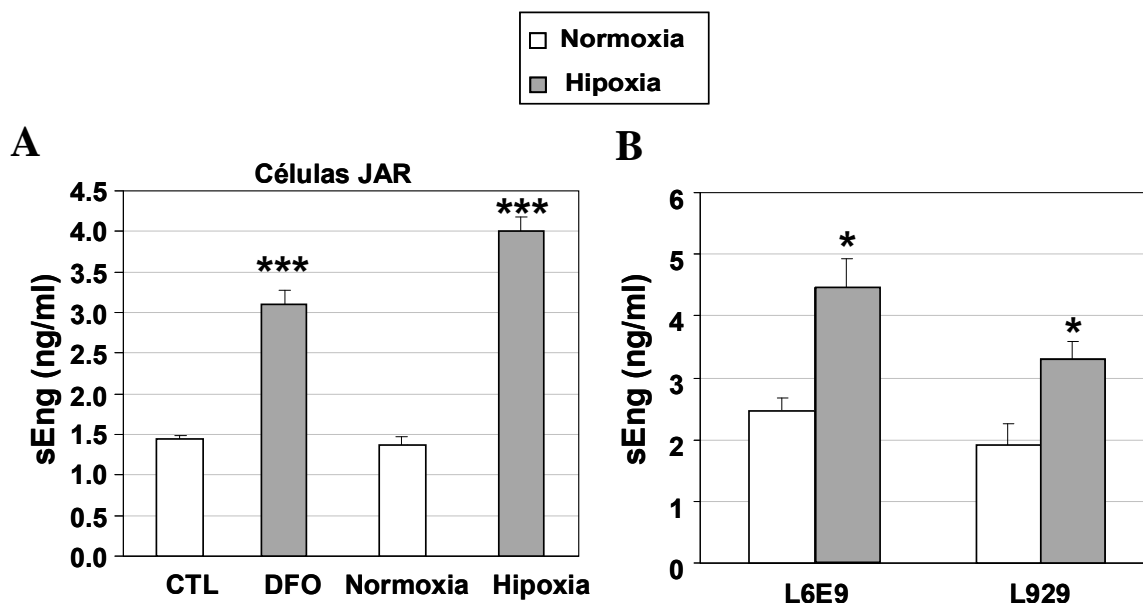


Figura 10. Efecto de la hipoxia en la liberación de sEng. A. Las células JAR se incubaron con desferroxiamina (DFO) o 1% de oxígeno durante 24 horas y los niveles de sEng se midieron mediante ELISA. B. Los transfectantes estables de mioblastos de rata (L6E9) y fibroblastos de ratón (L929), que expresan endoglina humana se incubaron en condiciones de hipoxia (1% oxígeno) durante 24 horas y los niveles de sEng se midieron mediante ELISA.

Puesto que la expresión de endoglina humana, codificada por un cADN, en estos transfectantes está controlada por un promotor viral, estos resultados excluyen la posibilidad de una regulación transcripcional de la misma o de un ajuste alternativo y sugieren la existencia de un mecanismo proteolítico responsable de la liberación de sEng durante la hipoxia.

Para comprobar la implicación de la hipoxia en la liberación de sEng se realizaron estudios de silenciamiento del ARNm de HIF-1 α , factor clave en el mecanismo de funcionamiento de la hipoxia. Para ello, se silenció HIF-1 α en las células JAR mediante siARN, y se sometió a las células a hipoxia o normoxia. Se utilizaron tres siRNAs distintos y el silenciamiento se monitorizó mediante qRT-PCR (Fig. 11A). Los sobrenadantes de estas células se analizaron por ELISA y se observó un marcado descenso de la liberación de sEng (Fig. 11B).

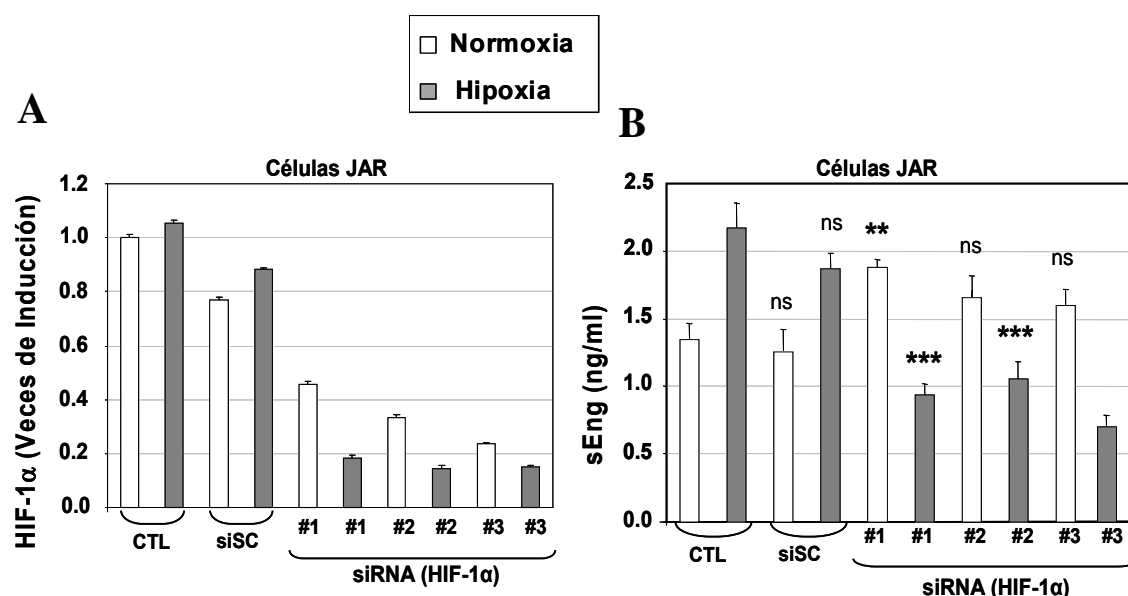


Figura 11. Efecto de la hipoxia en la liberación de sEng. Las células JAR se transfectaron con tres RNA interferentes (siRNA) distintos, para silenciar HIF-1 α . Después de 24 horas, se realizó una RT-PCR a tiempo real para medir la expresión de HIF-1 α (A), y los niveles de sEng se determinaron mediante ELISA (B). Un siRNA de secuencia aleatoria (siSC) se transfectó como control. También se emplearon células control sin tratar (CTL).

Existen muchas evidencias que asocian los altos niveles de sEng presentes en mujeres que sufren preeclampsia con un aumento del estrés oxidativo y un descenso de las defensas antioxidantes (Al-Gubory y col., 2010). Por ello, se planteó la pregunta de si la hipoxia podría ser capaz de inducir no sólo la liberación de sEng, sino también la formación de ROS en las células JAR. Para comprobarlo, estas células fueron sometidas a hipoxia en el incubador modular MIC-101 durante 24 horas y a continuación se incubaron con una sonda fluorescente, CM-H₂DCFDA, capaz de detectar ROS. Como se observa en los resultados de la citometría de flujo, la formación de ROS

se indujo 2,8 veces en las células JAR sometidas a hipoxia (Fig. 12A). Además, este aumento de las ROS fue bloqueado mediante el tratamiento con Trolox, un potente antioxidante derivado de la vitamina E. El Trolox también indujo una clara reducción de los niveles de sEng en condiciones de hipoxia (Fig. 12B). Estos resultados sugieren que las ROS son un componente de la vía de la hipoxia corriente abajo, y conducen a la liberación de cantidades crecientes de sEng.

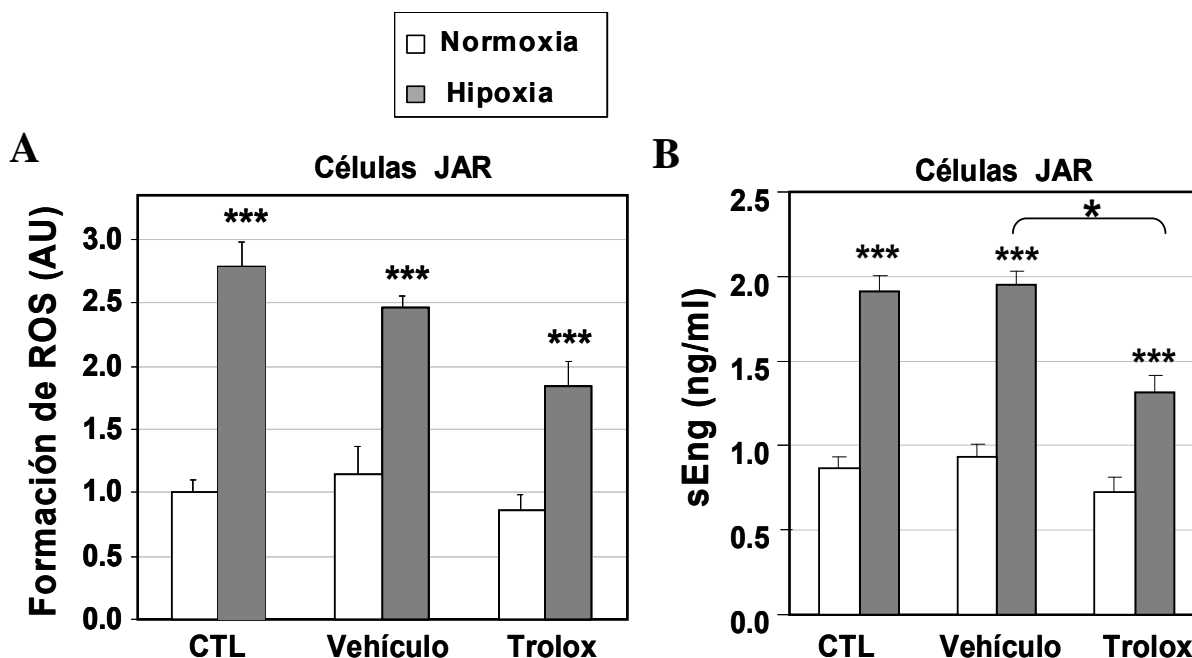


Figura 12. Efecto de la hipoxia en la liberación de sEng. Las células JAR se sometieron a condiciones de hipoxia (1% oxígeno) en presencia o ausencia del antioxidante Trolox. A continuación, las células JAR se incubaron con CM-H₂DCFDA, un indicador permeable a la célula para especies reactivas de oxígeno, y se determinó la formación de ROS mediante citometría de flujo (A). Los sobrenadantes de las células se recogieron y se analizaron los niveles de sEng mediante ELISA (B).

4.2 Los oxisteroles inducen la liberación de sEng a través de la vía de LXR

Uno de los efectos de la inducción de la formación de ROS en condiciones de hipoxia es la generación de oxisteroles en la célula (Murphy y Johnson, 2008). Por tanto, se decidió comprobar si este proceso ocurría en el modelo celular JAR. Para ello, las células se sometieron a hipoxia, se realizó una extracción lipídica de las mismas después de 24 horas, siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959), y se realizó un análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Cuando las células JAR se sometieron a hipoxia se observó un aumento de la formación del oxisterol 22(R)-hidroxicolesterol (22-R) en comparación con las células que se cultivaron en normoxia (Fig. 13).

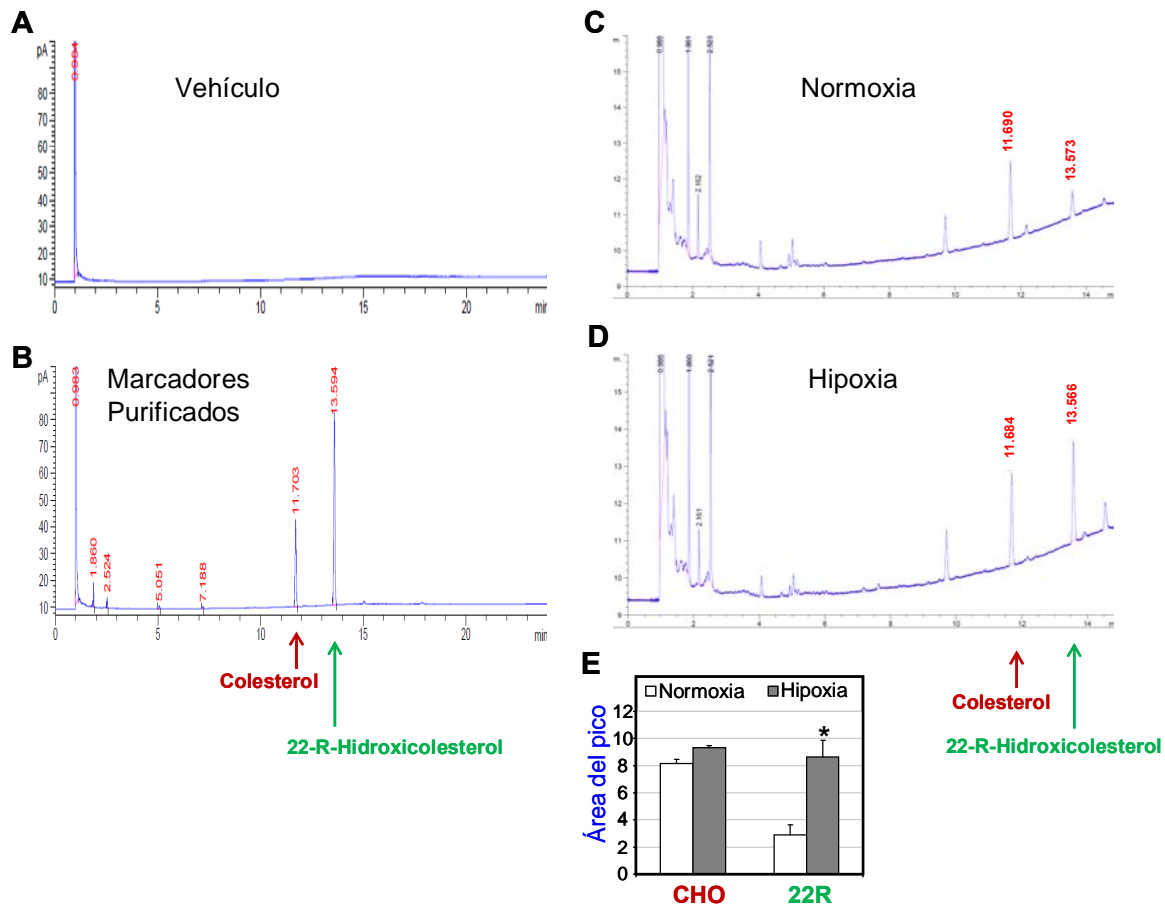


Figura 13. Análisis de colesterol y 22-R en los extractos celulares. Los lípidos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) empleando el equipo Agilent 7890A (Agilent Technologies). En los paneles **A-D** el eje horizontal representa el tiempo de elución, mientras que el eje vertical representa la intensidad de la señal en picoamperios (pA). El panel **A** muestra el perfil del disolvente (vehículo), mientras el panel **B** muestra los dos marcadores control, colesterol y 22-R purificados. En los paneles **C** y **D** los extractos lipídicos de las células JAR, incubadas en hipoxia o normoxia durante 24 horas, se analizaron por GC-MS. El tiempo de elución y posición de los picos del colesterol y 22-R se indican en la figura. El área de estos picos se midió en tres experimentos diferentes y la media de ellos se representa en el panel **E**. Los niveles de 22-R en las células JAR sometidas a hipoxia mostraron un marcado aumento (~4 veces de inducción) respecto a las células sometidas a normoxia. La identificación de los picos obtenidos en GC-MS se confirmó con la información disponible en los bases de datos de MS.

Puesto que los oxisteroles señalizan a través de los receptores LXR (A-González y Castrillo, 2011) y la expresión de endoglina se induce por la activación de la vía de LXR mediante la unión del agonista sintético T09 (Henry-Berger y col., 2008), se decidió comprobar la implicación de la vía de LXR en la liberación de sEng.

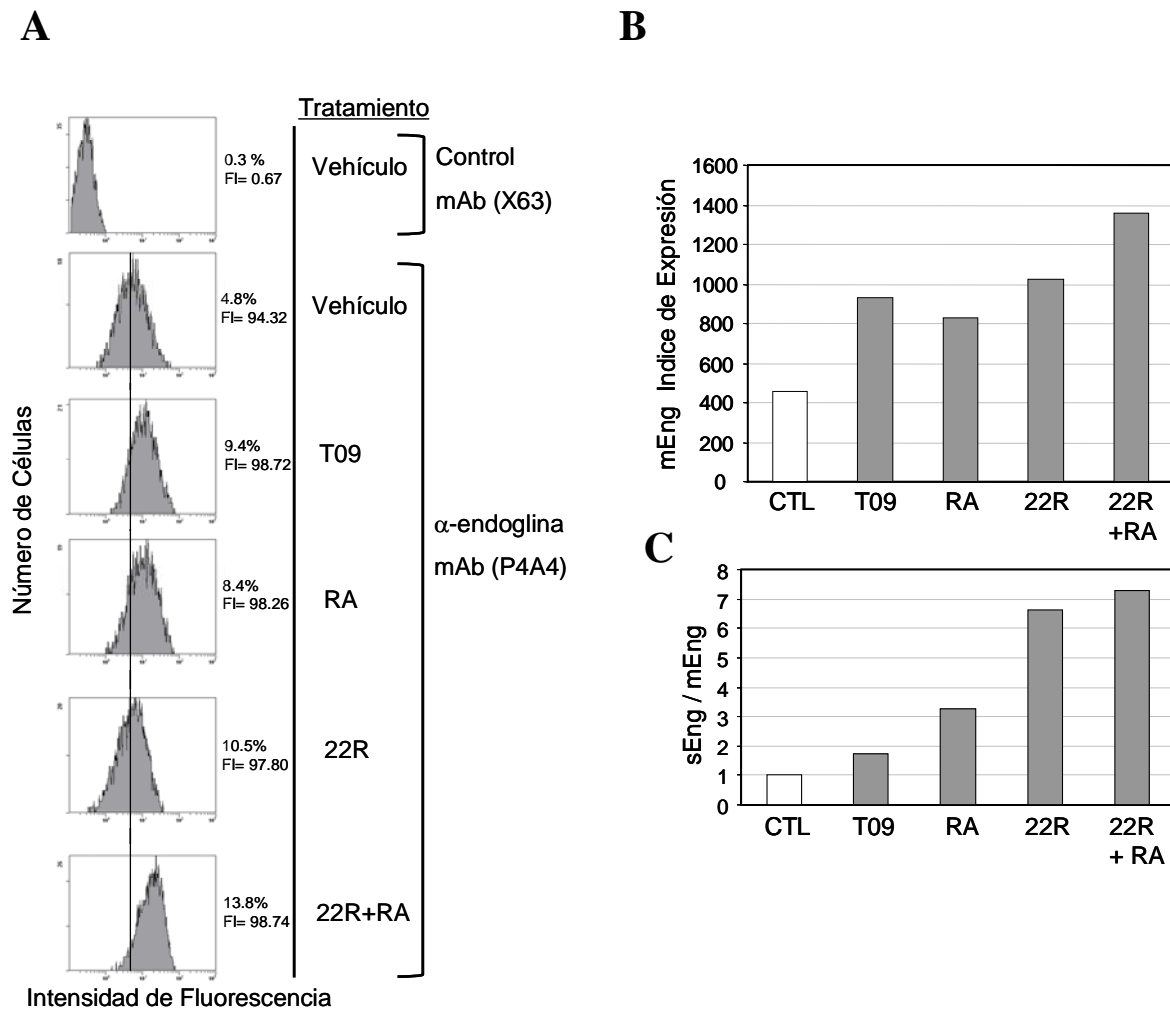


Figura 14. Efecto de los ligandos de LXR sobre la expresión de endoglina. Las células JAR se incubaron con T09, RA, 22-R o vehículo (0.1% de etanol en medio de cultivo), durante 24 horas. Las células se analizaron por citometría de flujo de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-endoglina P4A4, empleando como control negativo el mAb X63. El porcentaje de células positivas y la intensidad de fluorescencia promedio se indican en el panel **A**. **B**. El índice de expresión de endoglina de membrana (mEng) se calculó empleando los datos del panel **A**, multiplicando el porcentaje de células positivas por la intensidad de fluorescencia promedio de cada muestra. Los medios condicionados se almacenaron adecuadamente para medir los niveles de sEng mediante ELISA. **C**. Comparativa de la inducción de endoglina soluble (sEng) por LXR frente a la inducción de la endoglina de membrana (mEng). A la relación entre el índice de expresión de mEng (**B**) y las concentraciones de sEng se le dio un valor arbitrario de 1 en la muestra sin tratar (CTL). Se observó un marcado aumento de la relación sEng/mEng debido al tratamiento con los ligandos.

Como se esperaba, el tratamiento de las células JAR con T09 provocó un aumento de la endoglina de superficie celular (Fig. 14A y B). Además, el tratamiento con el ligando fisiológico de LXR, 22-R y con el ligando de RXR, RA, indujeron fuertemente la liberación de sEng (Fig.

14C y 15A). Es interesante resaltar que se observó una fuerte cooperación sinérgica entre el 22-R y el RA en lo que a la liberación de sEng se refiere.

Por otro lado, se trataron cultivos primarios de células endoteliales humanas (HUVECs) con los ligandos de LXR, T09 y 22R, y el ligando de RXR, RA, observándose un comportamiento similar al de la línea celular JAR, es decir, un claro aumento de los niveles de sEng (Fig. 15B).

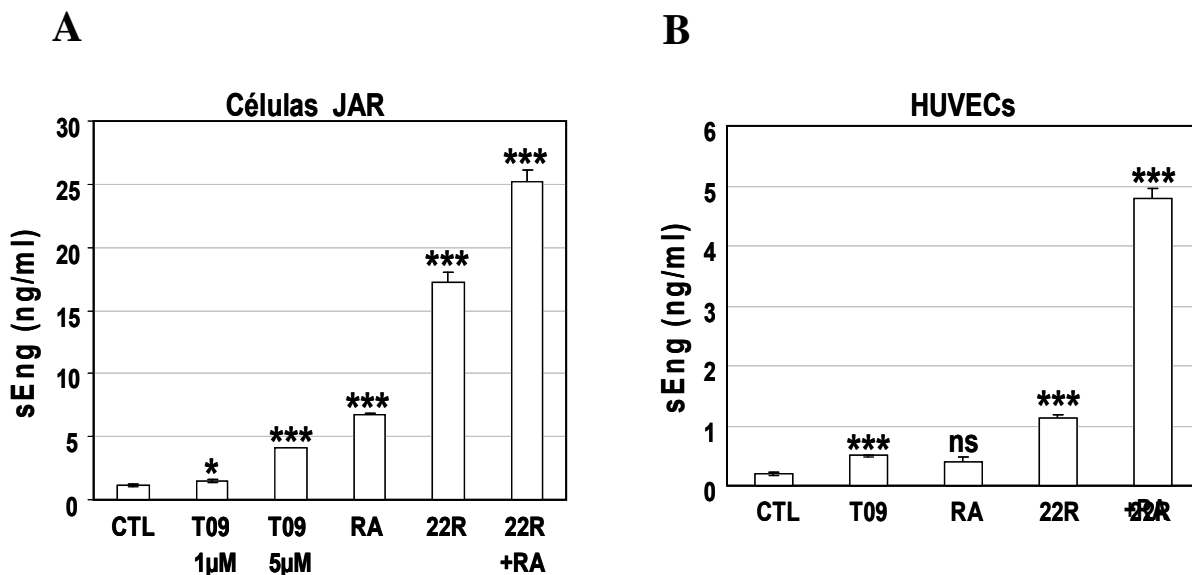


Figura 15. Efecto de los ligandos de LXR sobre la producción de sEng. Las células se trataron con diferentes combinaciones de T09, RA y 22-R durante 24 horas y se analizaron los niveles de sEng en los sobrenadantes mediante ELISA. **A.** Células JAR. **B.** HUVECs.

La implicación de los receptores nucleares LXR en la liberación de sEng, se confirmó utilizando MEFs derivadas de ratones doble KO para LXR α,β (-/-). Estos fibroblastos fueron transfectados con endoglina humana y tratados con T09, observándose un marcado aumento de los niveles de liberación de sEng en las MEFs provenientes de ratones salvajes, mientras las MEFs obtenidas de los ratones doble KO para LXR no respondieron al tratamiento con T09 (Fig. 16).

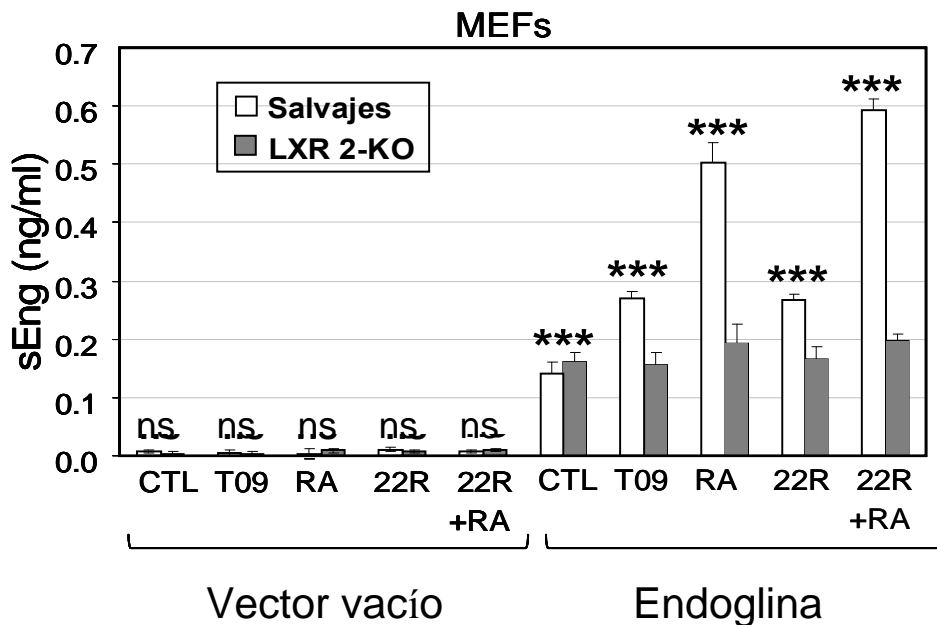


Figura 16. Implicación de la vía de LXR en la producción de sEng. Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) provenientes de ratones salvajes o doble KO para $LXR\alpha,\beta$ (2-KO) se transfectaron con un vector que codifica endoglina humana o un vector vacío antes del tratamiento con ligandos de LXR. Después de 24 horas los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA.

Tal como se mencionó anteriormente (Fig. 10B), los transfectantes estables de endoglina humana (mioblastos de rata y fibroblastos de ratón) muestran un aumento en la liberación de sEng cuando son cultivados en hipoxia. De forma similar, también se observa un aumento en los niveles de sEng cuando dichos transfectantes son tratados con agonistas de LXR y RXR (Fig. 17).

Puesto que la expresión de endoglina a partir de ADNc en dichos transfectantes está controlada por un promotor viral, estos resultados excluyen una posible regulación transcripcional responsable de la liberación de sEng y por lo tanto confirman la hipótesis de un corte proteolítico de la endoglina de membrana activado mediante la vía de LXR.

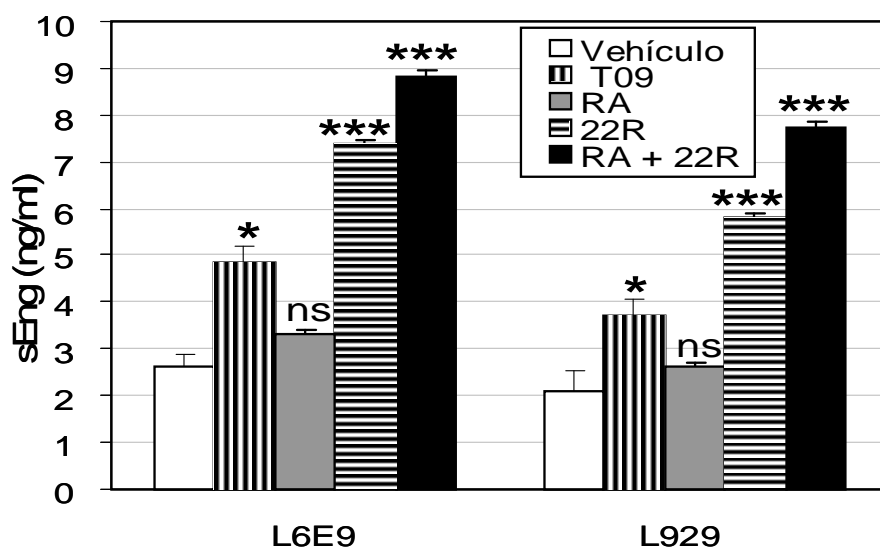


Figura 17. Efecto de los ligandos de LXR sobre la producción de sEng. Los mioblastos de rata (L6E9) y los fibroblastos de ratón (L929), transfectantes estables de endoglina humana se trataron con los ligandos de LXR durante 24 horas y los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA.

4.3 Los receptores LXR modulan el corte proteolítico de endoglina a través del inhibidor de MMP-14, TIMP-3

Puesto que se ha descrito que la metaloproteasa MMP-14 es la principal responsable del corte de endoglina (Hawinkels y col, 2010) y el inhibidor de MMP-14, TIMP-3 es un gen diana de la vía de LXR (Hoe y col., 2007), se decidió comprobar si la expresión de TIMP-3 estaba modulada por LXR e hipoxia en las células JAR. La figura 18A muestra los resultados de una RT-PCR semicuantitativa. Se observa una disminución significativa de los niveles de ARNm de TIMP-3 cuando las células se sometieron a tratamiento con T09. Además, mediante qRT-PCR, se observa que la hipoxia disminuye significativamente los niveles de ARNm de TIMP-3 y sin embargo no afecta al transcrito de TIMP-2 (Fig. 18A). Los niveles de proteína de TIMP-3 también disminuyeron como consecuencia del tratamiento de las células JAR con ligandos de LXR y RXR y cuando las células se sometieron a hipoxia (Fig. 18B).

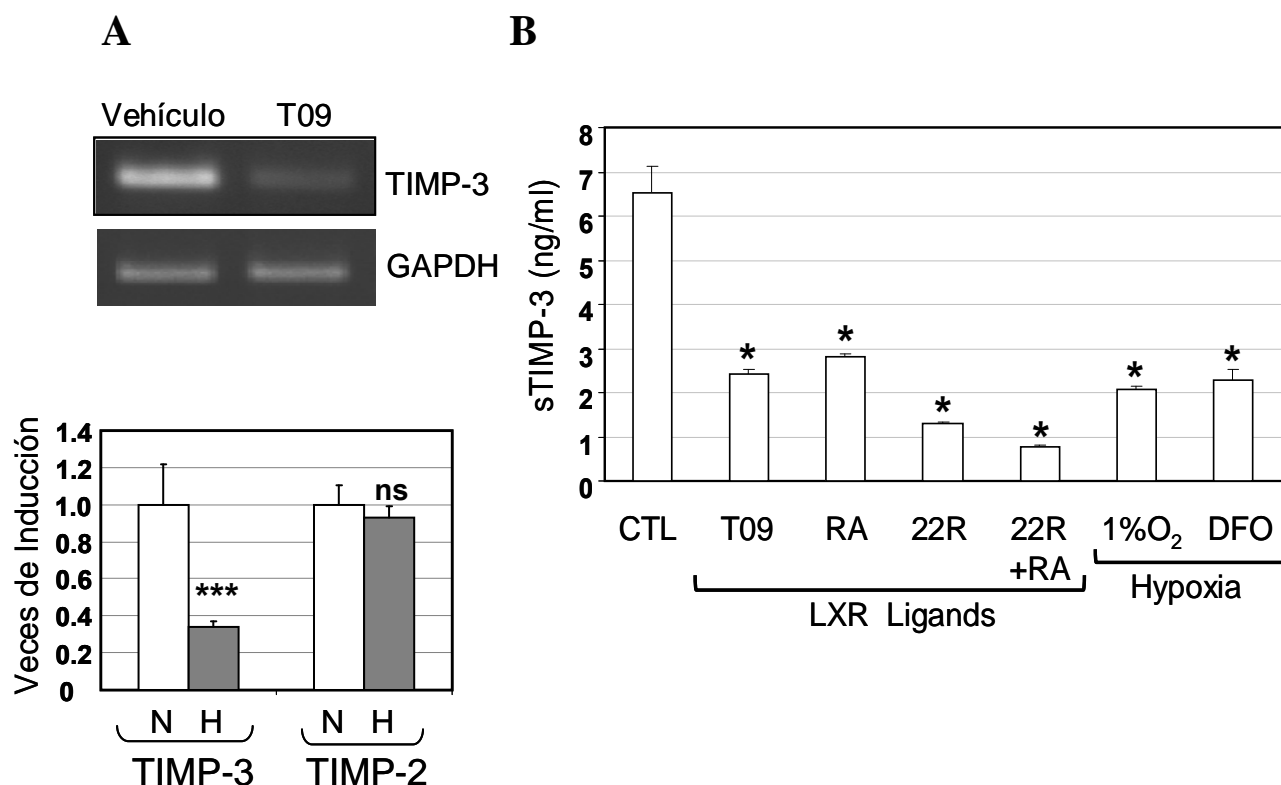


Figura 18. Implicación de TIMP-3 en la vía LXR/oxisterol. **A.** Las células JAR se trataron con T09 durante 24 horas y se extrajo el ARN total. El análisis por RT-PCR semicuantitativa muestra que los niveles de ARNm de TIMP-3 se redujeron como consecuencia del tratamiento. Como control, se utilizó GAPDH, cuyos niveles de ARNm no cambiaron. Las células JAR se sometieron a hipoxia (H) o normoxia (N) y los niveles de ARNm de TIMP-3 y TIMP-2 se midieron mediante qRT-PCR. **B.** Las células JAR se trataron con T09, RA, 22-R, DFO o 1% de oxígeno durante 24 horas. Los medios condicionados se recogieron y los niveles de TIMP-3 se analizaron mediante ELISA.

Para confirmar la implicación de TIMP-3, se decidió silenciar dicha proteína utilizando tres siRNAs distintos y monitorizando el silenciamiento mediante qRT-PCR (Fig. 19A). Los medios condicionados de las células sometidas al silenciamiento se analizaron mediante ELISA, observándose un aumento de los niveles de sEng en las células donde se había silenciado parcialmente TIMP-3 (Fig. 19B).

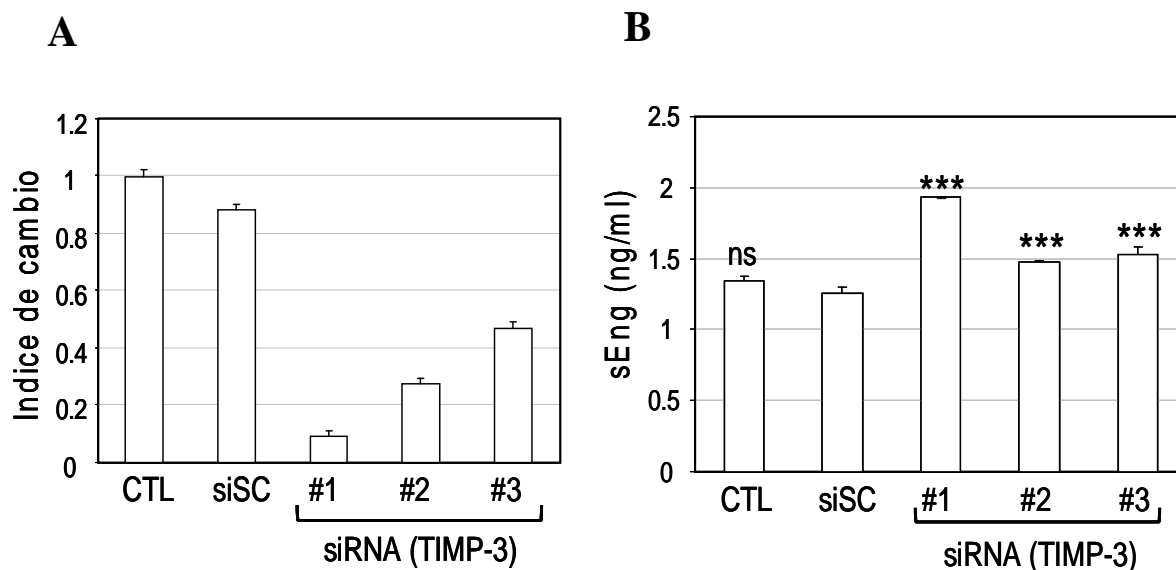


Figura 19. Implicación de TIMP-3 en la producción de sEng. Las células JAR se transfectaron con tres RNA interferentes (siRNA) para silenciar TIMP-3. Después de 24 horas, se realizó una RT-PCR a tiempo real para medir la expresión de TIMP-3 (A), mientras que los niveles de sEng se determinaron por ELISA (B). Un siRNA de secuencia aleatoria (siSC) se transfectó como control.

Las células JAR se incubaron con la proteína TIMP-3 recombinante humana observándose una drástica disminución de los niveles de sEng inducidos por T09 (Fig. 20).

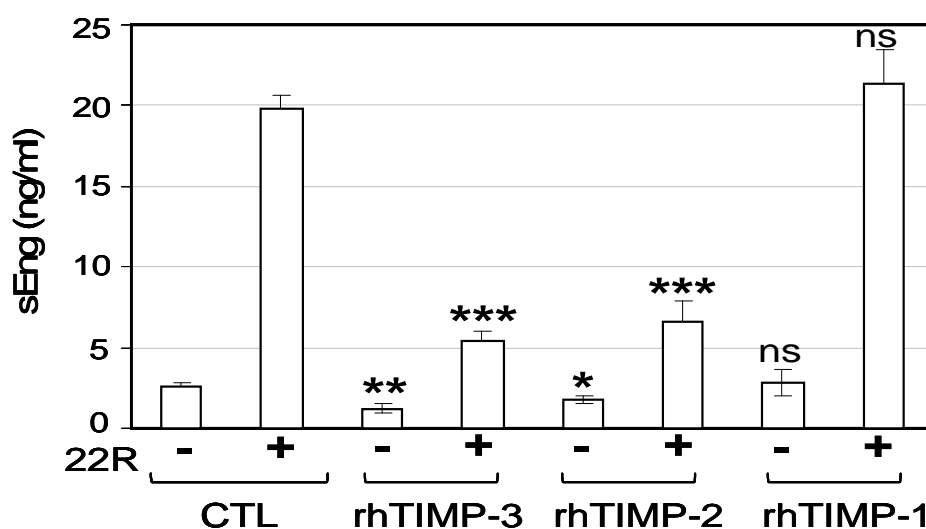


Figura 20. Efecto de TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 en la liberación de sEng dependiente de la vía LXR/oxisterol. Las células JAR se trataron con las proteínas TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 recombinantes humanas durante 24 horas en presencia o ausencia de 22R y los niveles de sEng liberados al medio condicionado se analizaron mediante ELISA.

4.4 MMP-14 está implicada en la liberación de endoglina soluble en células JAR

TIMP-2 y TIMP-3 son inhibidores de la metaloproteasa MMP-14, que ha sido descrita recientemente como la principal proteasa implicada en el corte de endoglina (Hawinkels y col, 2010). Por lo tanto, se decidió estudiar el papel de MMP-14 en la liberación de sEng en células JAR. Como se muestra en la figura 21A, los niveles de sEng en el medio condicionado de células JAR que sobre-expresan MMP-14 están aumentados más de dos veces con respecto a las células control. Por otro lado, se observó que la co-expresión de MMP-14 y endoglina humana en células COS-7 (que no expresan endoglina de forma endógena) indujo claramente la liberación de sEng al medio condicionado (Fig. 21B).

Puesto que T09 disminuye los niveles del inhibidor de MMP-14, TIMP-3 (Fig. 18), se planteó la pregunta de si el tratamiento de células JAR con agonistas de LXR provocaría un aumento de la actividad de MMP-14. Para comprobarlo, se empleó el péptido fluorogénico Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂, que es sustrato de MMP-14. Como se observa en la Fig. 21C, la actividad de MMP-14 aumentó significativamente en respuesta a T09. Como control, se empleó doxiciclina, que es un inhibidor general de proteasas de amplio espectro.

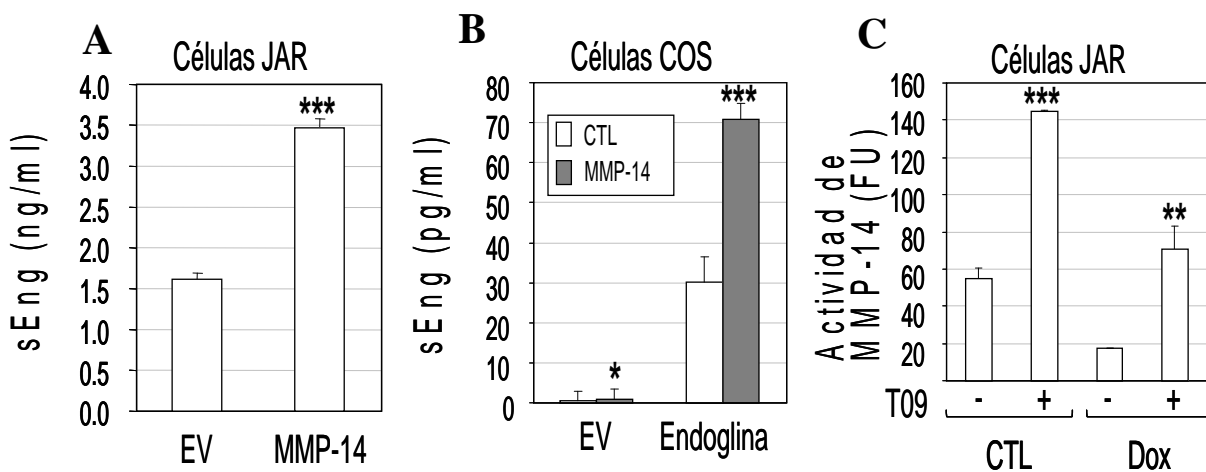


Figura 21. Implicación de MMP-14 en la liberación de sEng. **A.** Las células JAR se transfectaron de manera transitoria con un vector que codifica MMP-14 o un vector vacío (EV) y se midieron los niveles de sEng mediante ELISA. **B.** Células COS se co-transfectaron de manera transitoria con un vector que codifica endoglina o un vector vacío (EV) en presencia o ausencia de un vector que codifica MMP-14. Los niveles de sEng en el medio de cultivo se midieron mediante ELISA. **C.** Las células JAR se cultivaron en presencia o ausencia de T09 o el inhibidor de MMPs doxiciclina (Dox) durante 24 horas. A continuación, el sustrato fluorogénico de MMP-14, Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂ se añadió al cultivo y se determinó la fluorescencia (FU).

Fue interesante observar que el sitio de corte de MMP-14, G-L, presente en el péptido fluorogénico, se encuentra en dos péptidos yuxtamembrana del dominio extracelular de endoglina. Todo esto llevó a postular un posible efecto modulador de estos péptidos en la liberación de sEng. Para comprobar esta hipótesis, se sintetizaron tres péptidos a partir de regiones evolutivamente conservadas de la secuencia de endoglina (Fig. 22); se incubó MMP-14 recombinante con el sustrato fluorogénico en presencia de los péptidos P447 y P583 y se comprobó que dichos péptidos por sí solos o la combinación de los mismos, eran capaces de inhibir significativamente la actividad de MMP-14, sugiriendo que dichas secuencias de endoglina eran dianas para MMP-14. Como control negativo, se incubó con el péptido P230, que no posee el motivo GL, y se observó que no tenía ningún efecto sobre la actividad de MMP-14 (Fig. 22A).

Puesto que el péptido P583 mostraba el mayor efecto inhibitorio y debido también a que la posición de su motivo GL encaja con el tamaño descrito de endoglina soluble (Hawinkels y col., 2010), se empleó éste para los estudios posteriores. Para comprobar que el péptido P583 podía competir con el proceso de corte proteolítico de endoglina de membrana, se midieron los niveles de sEng de las células JAR en presencia de dichos péptidos. El péptido P583 fue capaz de disminuir significativamente los niveles basales de sEng, a diferencia del péptido P230, sugiriendo que esta secuencia de endoglina mimetiza la secuencia natural de la endoglina de membrana, interfiriendo con la actividad proteolítica de MMP-14 (Fig. 22B). Como control, las células JAR se incubaron con el inhibidor de proteasas doxiciclina y se observaron niveles de inhibición similares que con el péptido P583.

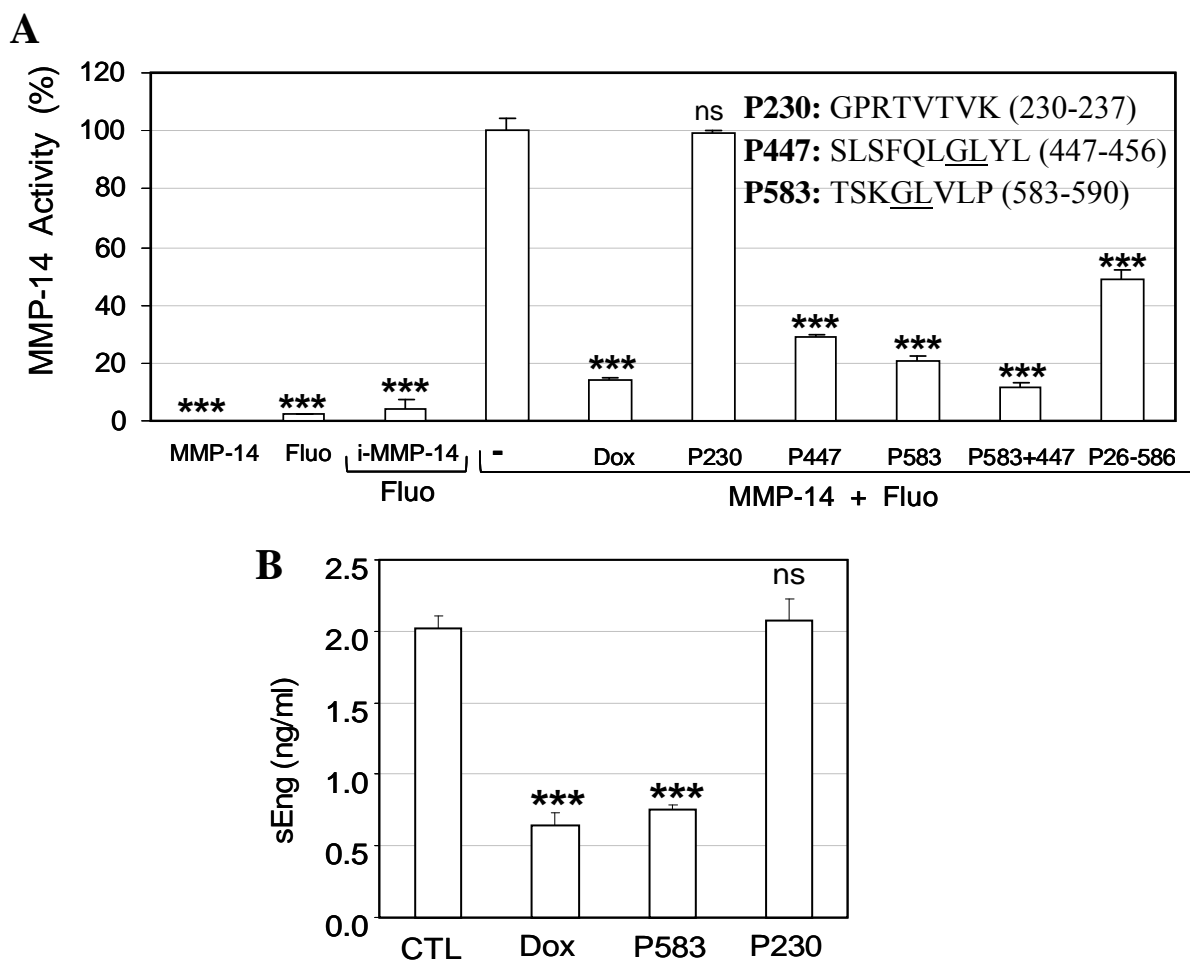


Figura 22. Efecto de los péptidos de endoglina en la actividad de MMP-14. **A.** En un sistema libre de células, MMP-14 humana recombinante se activó con APMA y se añadió el sustrato fluorogénico Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂ (Fluo) en presencia o ausencia de los péptidos de endoglina (P230, P447 o P583) o una versión recombinante del dominio extracelular de endoglina (Glu26-Gly586; P26-586). Como controles negativos se emplearon MMP-14, el péptido fluorogénico (Fluo) y MMP-14 inactiva (iMMP-14). Después de una incubación de una hora a 37°C, se añadió solución de parada y se determinó la fluorescencia. **B.** Efecto de los péptidos de endoglina en la liberación de sEng. Las células JAR se cultivaron durante 48 horas en presencia de los péptidos de endoglina P583 (diana de la actividad de MMP-14) y P230 (control negativo) o doxiciclina (Dox). Los medios de cultivo se recogieron y los niveles de sEng se analizaron mediante ELISA.

Teniendo en cuenta que la actividad de MMP-14 se induce por los ligandos de LXR (Fig. 21C), se decidió comprobar si la expresión de MMP-14 también estaba modulada por la vía de LXR. Para ello, se sometieron las células JAR a hipoxia y también se incubaron células JAR con diferentes combinaciones de ligandos del heterodímero LXR/RXR (T09, RA y 22-R), observándose un aumento de MMP-14 en la superficie celular después del tratamiento (Fig. 23).

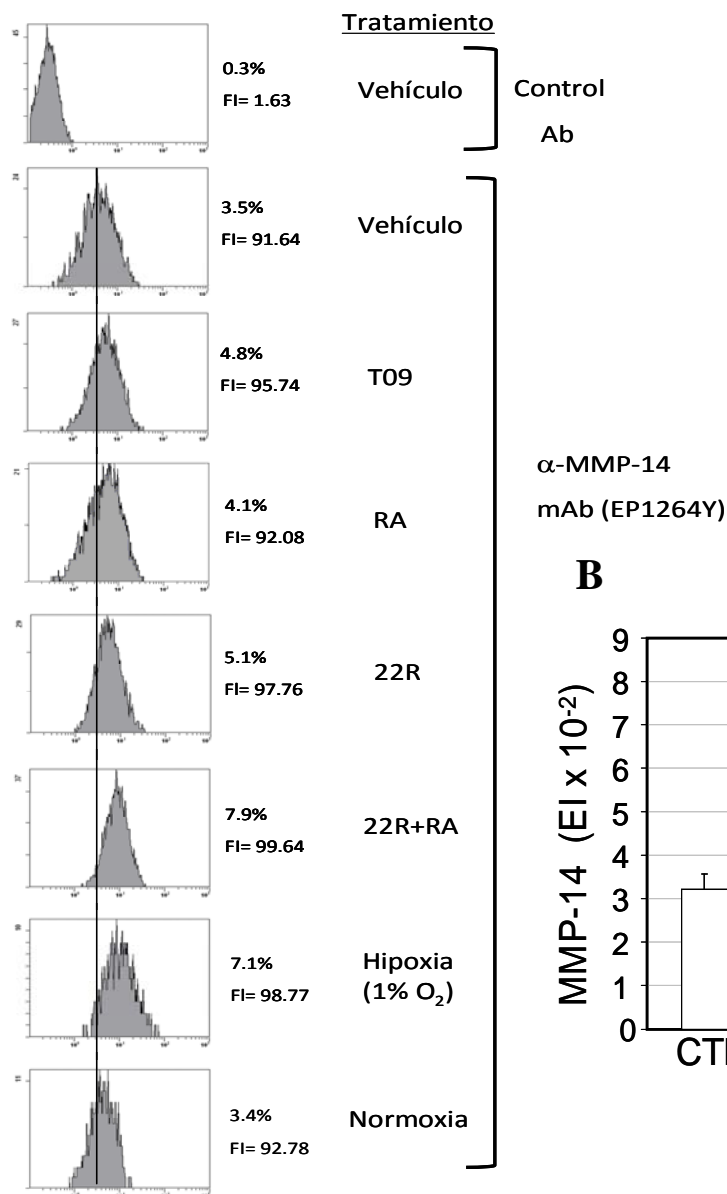
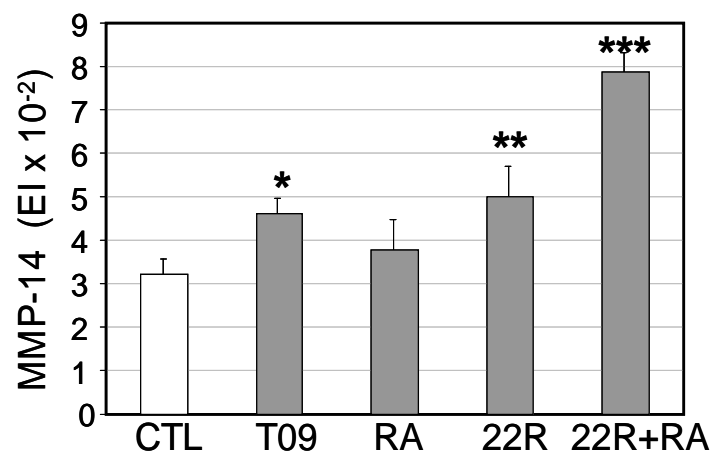
A**B**

Figura 23. Efecto de los ligandos de LXR en la expresión de MMP-14. Las células JAR se incubaron con T09, RA, 22-R o el vehículo (0.1% de etanol en el medio de cultivo) o se sometieron a hipoxia, durante 24 horas. Las células se emplearon para medir la MMP-14 de la superficie celular mediante citometría de flujo de inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-MMP-14 (EP1264Y), empleando otro anticuerpo como control negativo. El porcentaje de células positivas y la intensidad de la fluorescencia (IF) promedio se indican en el panel **A**. Se observó un aumento de la expresión de MMP-14 debido al tratamiento con los ligandos de LXR y a la hipoxia; el índice de expresión (EI) de la MMP-14 unida a membrana se representó en el panel **B**.

También se quiso comprobar si el efecto producido por el oxisterol 22-R en las células JAR era reproducible con explantes placentarios humanos. Para ello, dichos explantes se incubaron en presencia del ligando de LXR, 22-R, durante 24 horas. El tratamiento de los explantes con 22-R produjo un aumento de los niveles de sEng liberados (Fig. 24A), comparado con el control. Este aumento de liberación de sEng fue inhibido por la presencia del péptido P583 y sin embargo el péptido control P230 no ejerció ningún efecto. De manera similar a lo que se observó en las células JAR, el aumento de liberación de sEng se produce en paralelo al aumento de la actividad de MMP-14 (Fig. 24B); además, los niveles del inhibidor TIMP-3 disminuyen en los explantes placentarios humanos después del tratamiento con el oxisterol 22-R (Fig. 24C).

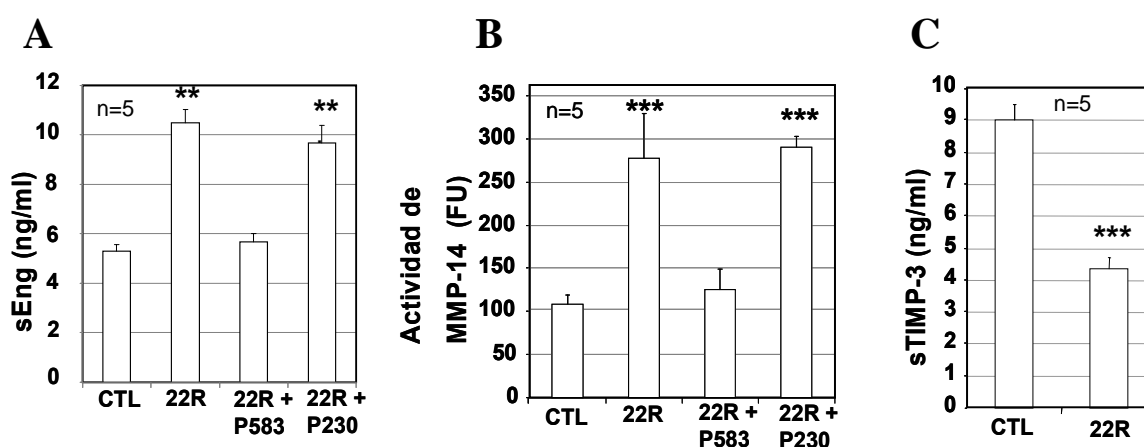


Figura 24. Efecto de los ligandos de LXR y los péptidos de endoglina en explantes placentarios humanos. A-C. Se empleó una mezcla de explantes placentarios humanos de 5 donantes distintas, que se incubó con 22-R, vehículo o los péptidos de endoglina P583 y P230 durante 24 horas. Se recogieron los medios condicionados y los niveles de sEng (A) y TIMP-3 (C) se midieron mediante ELISA. Los explantes se incubaron con el sustrato fluorogénico para MMP-14 y se midió la fluorescencia (B).

4.5 La activación de la vía de LXR *in vivo* aumenta los niveles de sEng y la presión arterial sistólica

A continuación, se quiso ver si los resultados con células cultivadas se reproducían en un modelo animal. Para ello, ratones macho fueron tratados con el agonista sintético de LXR, T09 o el ligando fisiológico 22-R durante 5 días. Las figuras 25A y B muestran que la presión arterial sistólica aumenta considerablemente durante el tratamiento con ambos ligandos. Además, los niveles de sEng de los ratones tratados con T09 o 22-R también aumentaron significativamente (Figs. 25D y E). De manera similar ratones hembra preñadas tratadas con 22-R mostraron un aumento de la presión arterial sistólica (Fig. 25C) y un aumento de los niveles de sEng (Fig. 25F).

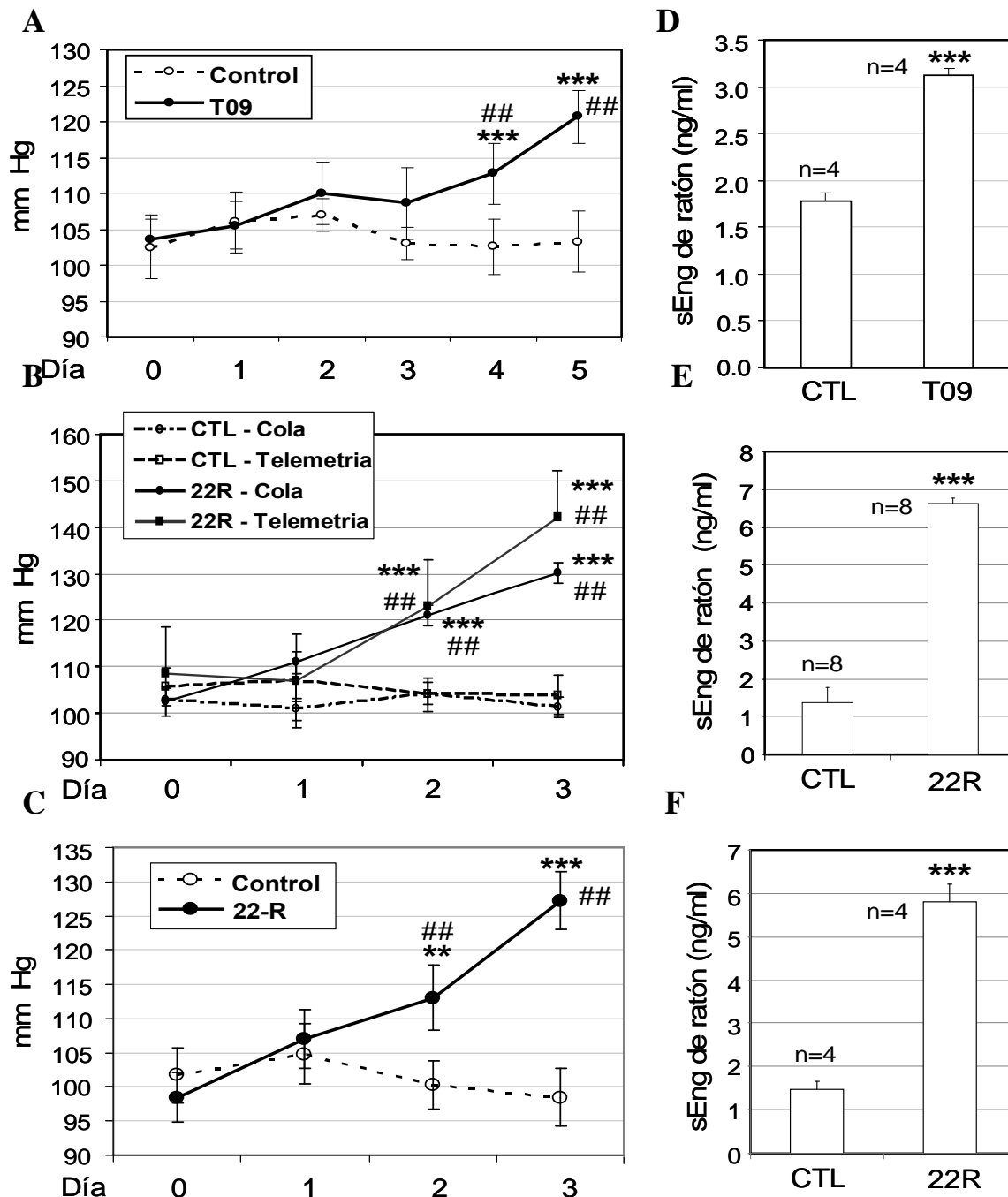


Figura 25. Efecto de los ligandos de LXR en la presión arterial. A los ratones macho se les inyectó intraperitonealmente de forma diaria T09 o vehículo (Control) en un periodo de 5 días (**A** y **D**). A ratones macho (**B,E**) o hembras preñadas (**C,F**) se les inyectó diariamente de forma intravenosa 22-R o vehículo. Durante el tratamiento, la presión arterial sistólica se midió diariamente con un esfigmomanómetro de cola (NIPREM 546) (**A-C**) o por telemetría (**B**). El último día de tratamiento las medidas en cola de las hembras preñadas se confirmaron mediante medidas directas intracarótidas (**C**). Al finalizar el tratamiento, se sacrificaron los ratones, se recogieron muestras de suero y los niveles de sEng se determinaron mediante ELISA (**D, E** y **F**). El número de animales (n) empleado en cada experimento se indica en los paneles.

Paralelamente se realizaron medidas de la presión arterial media y diastólica de los ratones macho tratados con 22-R y como se puede observar en la fig. 26 ambas medidas muestran una respuesta similar a la observada con la presión arterial sistólica.

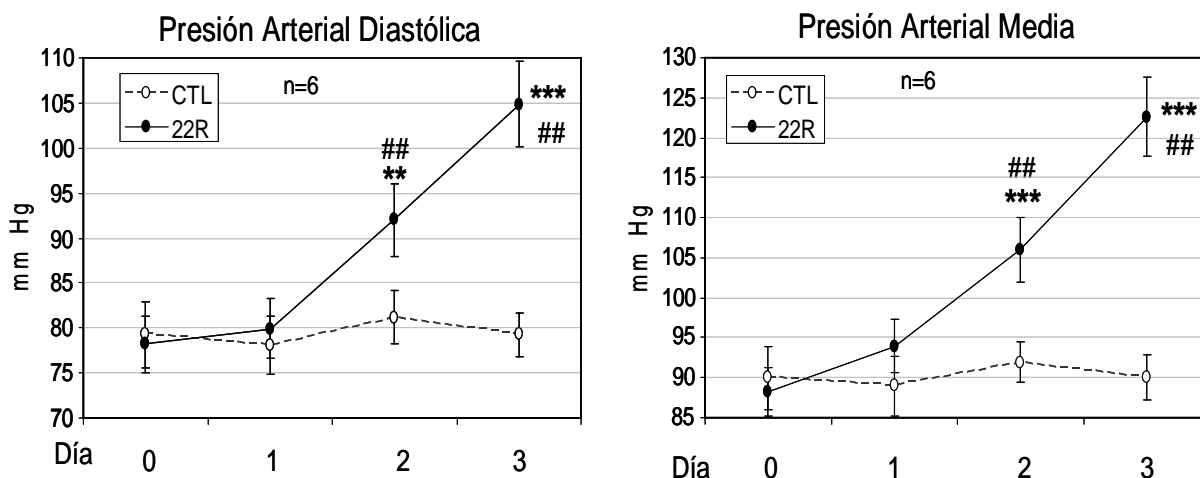


Figura 26. Efecto de los ligandos de LXR en la presión arterial diastólica y media. A los ratones macho se les inyectó de forma intravenosa 22-R o vehículo a diario. Durante el tratamiento, la presión arterial diastólica y la media se midieron diariamente por telemetría.

Cuando se analizó la orina de los ratones a los que se les había inyectado el oxisterol 22-R y el vehículo, se observó que los ratones tratados presentaban proteinuria, un síntoma asociado a la preclampsia (Fig. 27).

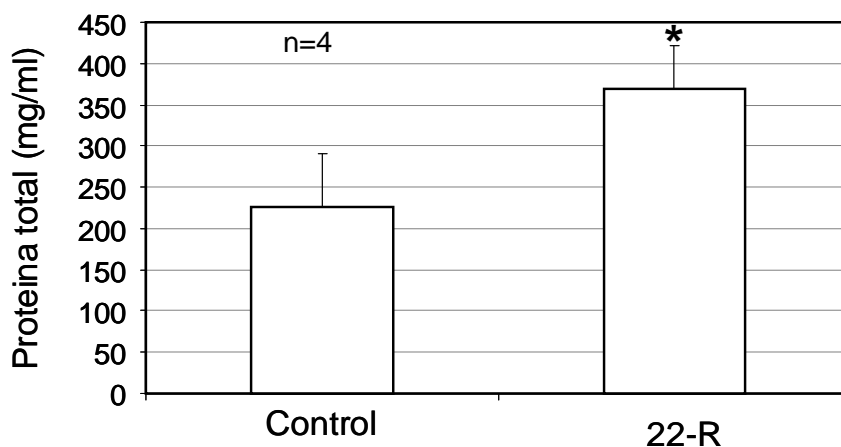


Figura 27. Efecto del ligando de LXR, 22-R en la proteinuria. A ratones macho se les inyectó diariamente de forma intravenosa 22-R o vehículo (Control). Durante el tratamiento la presión arterial sistólica se midió por telemetría (Fig. 25B). El último día de tratamiento se recogieron muestras de orina de los ratones y la concentración total de proteína en las mismas se analizó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford. El número (n) de animales empleados se indica en la figura.

En vista del resultado de la proteinuria, se decidió analizar otros marcadores de la preclampsia, como son sFlt1 y PLGF, tanto en los explantes placentarios tratados con 22-R y el péptido bloqueante, como en el suero de los ratones macho a los que se les inyectó 22-R y a los que se les co-administró el péptido bloqueante. Como se puede observar en los resultados de los ELISAs, no se observaron diferencias en dichos marcadores tanto en el caso de los explantes placentarios (Fig. 28 A y B), como en el de los ratones (Fig. 28 C y D).

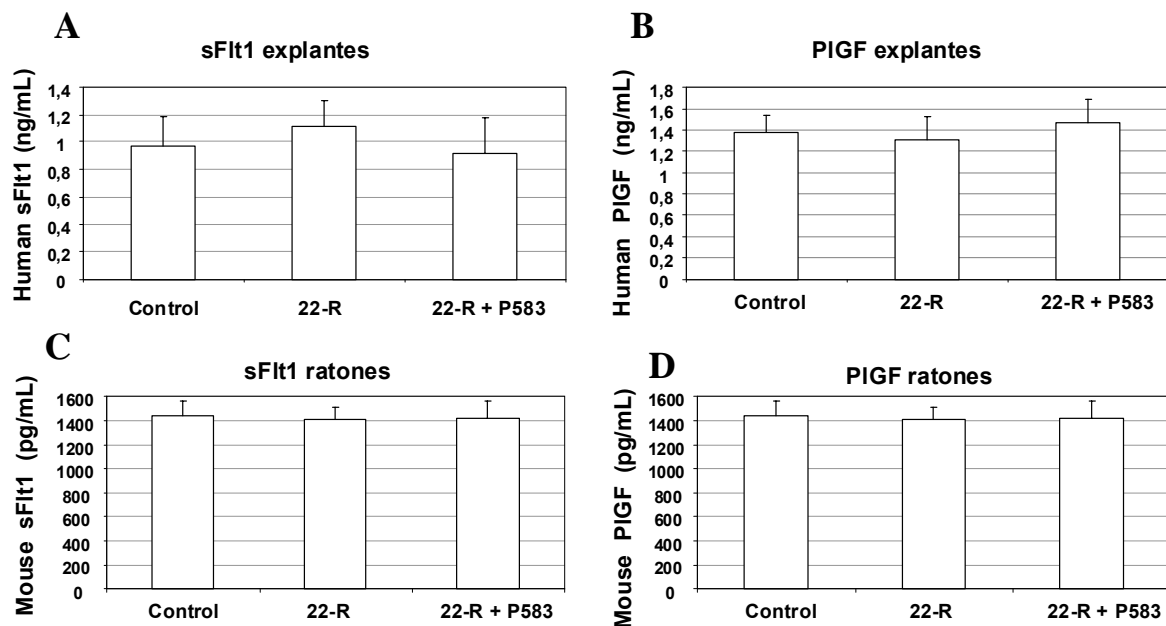


Figura 28. Efecto del oxisterol 22-R y el péptido de endoglina en los marcadores de preclampsia sFlt1 y PIGF. Los explantes placentarios se incubaron durante 24 horas con el ligando de LXR, 22-R y el péptido bloqueante de endoglina, P583. Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron los niveles de sFlt1 y PIGF mediante ELISA (A y B). A los ratones se les inyectó de forma intravenosa diariamente vehículo (CTL) o 22-R en ausencia o presencia del péptido P583. El último día de tratamiento (día 5), los ratones fueron sacrificados, se recogieron muestras de suero y se analizaron los niveles de sFlt1 y PIGF mediante ELISA (C y D).

El posible papel patogénico de MMP-14 y su producto proteolítico sEng en la respuesta hipertensiva ha sido comprobado por el grupo del Dr. López-Novoa utilizando otros dos modelos de ratón diferentes, uno en el que se sobre-expresa MMP-14 y otro en el que se sobre-expresa sEng. De hecho, la sobre-expresión de MMP-14 en los ratones *knock-in* después de 4 meses está asociada con un aumento de la presión arterial y de los niveles de sEng. Se pudo observar también, que 2 meses después de la sobre-expresión de MMP-14, la presión arterial sistólica no presentaba cambios. Sin embargo, se detectó un pequeño aumento de los niveles de sEng, sugiriendo que el aumento de la presión arterial sistólica no es consecuencia de la eliminación de la tetraciclina *per se*, sino que depende del aumento de la actividad de la metaloproteasa.

Además estos resultados son compatibles con los altos niveles de sEng. Por otro lado, los ratones transgénicos que sobre-expresan sEng humana, con altos niveles en plasma de sEng ($2,050 \pm 618$ ng/ml; indetectable en ratones WT) mostraban un aumento de la presión arterial sistólica respecto a los animales salvajes. Estos resultados sugieren que tanto MMP-14 como sEng pueden contribuir al fenotipo hipertenso.

4.6 El péptido de endoglina puede inhibir la liberación de sEng inducida por oxisteroles y la presión arterial sistólica

Puesto que se había observado que el péptido P583 puede interferir en la actividad de MMP-14 y el proceso de corte proteolítico de la endoglina de membrana *in vitro*, se quiso comprobar sus efectos *in vivo*. Para ello, se inyectó de forma intravenosa el oxisterol 22-R y se observó que el aumento de presión arterial sistólica que se producía podía ser inhibido por la co-administración del péptido P583 (Fig. 29A).

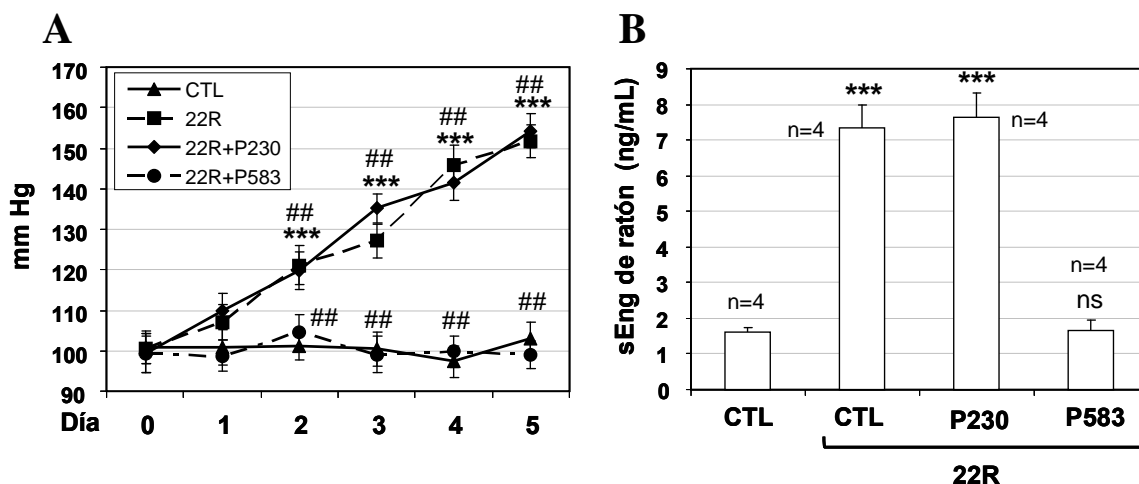


Figura 29. Efecto de los péptidos de endoglina en la presión arterial elevada inducida por oxisteroles. A los ratones se les inyectó diariamente de forma intravenosa vehículo (CTL) o 22-R en ausencia o presencia de los péptidos P230 o P583. Durante el tratamiento, la presión arterial sistólica se midió diariamente con un equipo NIPREM (A). El último día de tratamiento, los ratones fueron sacrificados, se recogieron muestras de suero y se analizaron los niveles de sEng mediante ELISA (B). El número de animales (n=4) empleados en cada experimento se indica en la figura.

Además, dicho péptido también disminuía los niveles de sEng (Fig. 29B), sugiriendo que el efecto hipertensor dependiente del oxisterol en este modelo animal está mediado por sEng. En contraste, la co-inyección de 22-R y el péptido P230 no afectó ni a la presión arterial sistólica ni a los niveles de sEng.

DISCUSIÓN

La preeclampsia es una de las complicaciones más graves del embarazo. Es responsable de los índices de mortalidad más elevados tanto para la madre como para el neonato. Aunque durante los últimos 20 años se han hecho grandes avances en la comprensión de su patofisiología, el mecanismo exacto por el que tiene lugar aún debe ser elucidado. Su patogénesis está relacionada con una placenta hipóxica. La hipoxia de la placenta es responsable de la disfunción vascular materna que ocurre debido al aumento de la liberación de factores anti-angiogénicos, como sFlt-1 y sEng. Estos receptores solubles son capaces de unirse a VEGF, PlGF y miembros de la superfamilia del TGF- β presentes en la circulación materna, contribuyendo así, a la disfunción endotelial en los tejidos maternos (Powe y col., 2011). En un embarazo normal también se produce inflamación sistémica, estrés oxidativo y alteraciones de los niveles de los factores angiogénicos, así como reactividad vascular. Tanto la placenta como la vasculatura materna son las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno capaces de producir poderosos pro-oxidantes que modifican covalentemente proteínas y alteran la función vascular en la preeclampsia. Estudios recientes han demostrado que una perfusión uteroplacentaria reducida provoca isquemia en la placenta y causa un aumento de los niveles de sFlt-1 y sEng en el suero, vinculando por lo tanto, la isquemia placentaria con la sobre-expresión de estos factores anti-angiogénicos (Foidart y col., 2009). Sin embargo, estos estudios aún no han sido capaces de elucidar el mecanismo por el cual la isquemia induce el aumento de estos factores anti-angiogénicos. Este trabajo se ha centrado en el mecanismo de liberación de sEng, diseccionando la vía implicada en el mismo (Fig. 30). Nuestros datos sugieren que los niveles elevados de sEng son consecuencia de la hipoxia, como se demuestra en los experimentos con las células JAR y los transfectantes estables que expresan endoglina humana, así como en los experimentos de silenciamiento de HIF-1 α (Fig. 10 y 11). El desarrollo de la hipoxia implica la generación de ROS (Fig. 12A). Todo esto encaja bien con los niveles elevados de ROS postulados en la preeclampsia (Al-Gubory y col., 2010). Ya que el colesterol es una diana natural de la ROS formándose los oxisteroles, investigamos la posible implicación de estos oxisteroles y sus receptores LXR en la generación de sEng. Así, con este trabajo se ha demostrado que los oxisteroles son capaces de aumentar la concentración de sEng actuando a tres niveles distintos. Los oxisteroles: i) aumentan los niveles de la endoglina de superficie celular de acuerdo con lo descrito anteriormente (Henry-Berger y col., 2008); ii) aumentan la expresión en superficie de MMP-14, una proteasa unida a membrana que puede cortar la endoglina de superficie (Hawinkels y col., 2010); y iii) inhiben la expresión de TIMP-3, un inhibidor de MMP-14 (Fig.

30). La sobre-expresión de sEng provocada por los oxisteroles ocurre a través de la vía de LXR como se demuestra en los experimentos con fibroblastos embrionarios de ratón $LXR\alpha,\beta^{-/-}$, sugiriendo que LXR juega un papel muy importante en la liberación de sEng (Fig. 16). Puesto que los embarazos normales se asocian con un aumento de la oxidación de partículas LDL y en embarazos con preeclampsia existe evidencia de una producción anormal de peróxidos lipídicos en la sangre materna (Walsh et al., 1993), se puede especular que un aumento de la internalización de oxisteroles por parte de los trofoblastos podría activar los receptores LXR y aumentar los niveles de endogлина de membrana y endogлина soluble. En este sentido, se ha descrito que los trofoblastos humanos y de ratón expresan niveles muy elevados de endogлина de superficie (Gougos y col., 1992). Y existen evidencias que demuestran la implicación de la vía de LXR en la biología de los trofoblastos. De hecho, los oxisteroles inhiben la diferenciación y la fusión de trofoblastos a través de la vía de LXR (Aye y col., 2011) y los lípidos y las lipoproteínas oxidadas de baja densidad y otros agonistas de LXR modulan la invasión de los trofoblastos (Pavan y col., 2004; Fournier y col., 2008). Ya que la expresión de endogлина regula la diferenciación y la invasión de los trofoblastos (Caniggia y col., 1997; Mano y col., 2011), sería interesante estudiar la contribución específica de la forma soluble de endogлина inducida por LXR en estos procesos.

Aunque la activación de la vía de LXR produce un aumento transcripcional de endogлина, y por lo tanto, aumenta la expresión de dicha proteína en la superficie celular (Henry-Berger y col., 2008), nuestros datos indican que el aumento de los niveles de sEng inducidos por los oxisteroles no solo responden a un aumento de los niveles de endogлина de superficie, sino también a un aumento en la actividad de MMP-14. De hecho, en los transfectantes estables de endogлина, que carecen del promotor de la misma y por lo tanto, de los elementos de respuesta a LXR presentes en él (Henry-Berger y col., 2008), también se induce la liberación de sEng en respuesta a la activación de LXR (Fig. 17). Un gen diana de LXR es TIMP-3 (Fig. 18A), un miembro de una familia de cuatro proteínas secretadas (TIMP-1 a TIMP-4) que son inhibidores endógenos de metaloproteasas de matriz (MMPs). Puesto que TIMP-3 es un inhibidor de MMP-14, la disminución de la expresión de TIMP-3, producida por LXR, puede conducir a la activación de MMP-14. Nuestros datos no solo apoyan esta hipótesis, sino que proporcionan pruebas del aumento de la expresión de MMP-14 debido a la activación de LXR (Fig. 23), sugiriendo que la expresión tanto de TIMP-3 como de MMP-14 están coordinadas en el tiempo para regular la liberación de sEng. Los resultados *in vitro* se confirmaron mediante experimentos *in vivo*. Así, la administración de T09 o del oxisterol 22-R a ratones macho y/o hembras preñadas produce un aumento de los niveles de sEng (Fig. 25). También se observó, que la sobre-expresión de MMP-

14 en ratones aumenta los niveles de sEng cuando se compara con los ratones salvajes. Basándonos en el comportamiento del péptido P583, que contiene el motivo de corte GL, para interferir la actividad de MMP-14 y el proceso de corte proteolítico de la endoglina de membrana *in vitro*, decidimos estudiar los efectos de este péptido *in vivo*. La co-inyección intravenosa de P583 con el oxisterol 22R es capaz de impedir la liberación de sEng que se produce debido a la activación de LXR, sugiriendo que este péptido podría tener uso terapéutico.

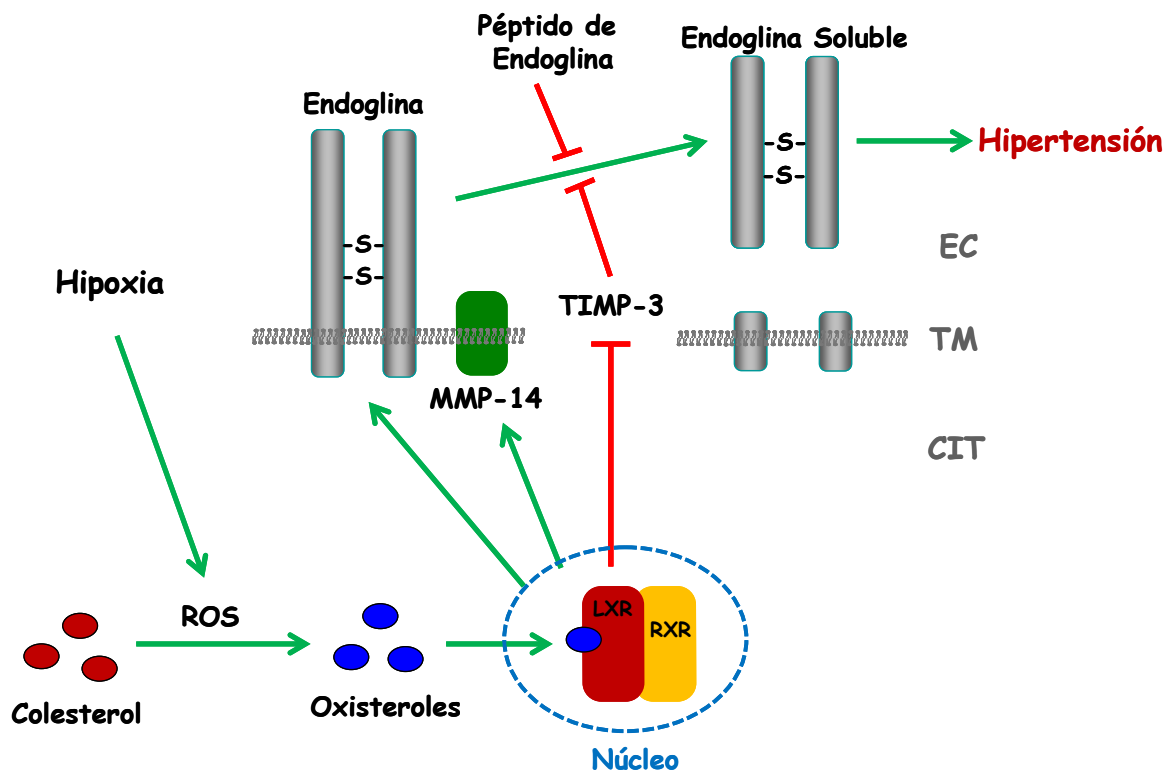


Figura 30. Modelo hipotético de la generación y papel de sEng en la homeostasis vascular. La hipoxia induce la formación de ROS, que a su vez convierten el colesterol en oxisteroles. Dichos oxisteroles se unen específicamente al dímero de receptores nucleares LXR/RXR, conduciendo a un aumento de los niveles de MMP-14 y a una disminución de los niveles del inhibidor de MMP-14, TIMP-3. Como resultado, se produce un aumento de la actividad de MMP-14, que corta proteolíticamente la región yuxtamembrana de la endoglina unida a la membrana y genera así la forma soluble, sEng. El aumento de los niveles de sEng conduce al aumento de la presión arterial sistémica en ratones. El tratamiento con un péptido de endoglina, que es sustrato de MMP-14, contrarresta la hipertensión producida por los oxisteroles *in vivo*.

Los experimentos demostraron que la administración del agonista T09 o el oxisterol 22-R producen no solo un aumento de los niveles de sEng sino también un aumento marcado de la presión arterial (sistólica, diastólica y media). Todo esto está en acuerdo con: i) la asociación entre un polimorfismo común del gen de LXR β y la preclampsia (Mouzat y col., 2011); ii) el aumento de sEng en la preeclampsia; y iii) el papel patogénico de sEng en la hipertensión. También de acuerdo con esta hipótesis se observó que los ratones transgénicos que sobre-

expresan sEng humana mostraban un claro aumento de la presión arterial sistólica junto con altos niveles de sEng circulante. Estos datos subrayan la importancia de la vía de oxisterol/LXR en la modificación de la presión arterial.

Tratar la hipertensión en la preeclampsia es muy importante debido a la ausencia de terapias efectivas. Sin embargo, los estudios *in vivo* de P583 ponen algo de esperanza en esta patología. De hecho, la co-inyección intravenosa de P583 con el oxisterol 22-R producen una inhibición del aumento de la presión arterial sistólica inducida por LXR. Puesto que la secuencia de P583, que es TSKGLVLP (aminoácidos 583-590), incluye el sitio de corte para MMP-14, GL, el mecanismo más probable por el que actúa dicho péptido es compitiendo con la endoglina de membrana por MMP-14. Una aplicación potencial de estos estudios es el uso terapéutico de este tipo de péptidos en mujeres con preeclampsia para contrarrestar el efecto patogénico de los niveles elevados de sEng. Son necesarios más estudios para confirmar el efecto anti-hipertensivo de este péptido en modelos experimentales de preeclampsia y en ensayos clínicos.

Finalmente, además de en preeclampsia, se han observado niveles elevados de sEng en el suero, plasma y otros fluidos de pacientes que sufren otras enfermedades, como el cáncer y patologías asociadas con disfunción endotelial como la hipertensión y la diabetes (Bernabeu y col., 2009; Blazquez-Medela y col, 2010; Fonsatti y col., 2010; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). Puesto que los niveles elevados de sEng se asocian con un mal pronóstico en pacientes con tumores sólidos con metástasis y con mayor daño en órganos diana en pacientes con hipertensión o diabetes (Blazquez-Medela y col, 2010), estos estudios podrían servir también para entender la función de sEng en dichas patologías.

CONCLUSIONES

1. La línea celular de coriocarcinoma humano Jar resulta ser un buen modelo para el estudio de endoglina y de la liberación de la forma soluble de la misma.
2. La hipoxia induce la liberación de endoglina soluble en la línea celular Jar y en los transfectantes estables que expresan endoglina humana, como se demuestra en los experimentos de hipoxia en cámara y química realizados con dichas células y en los experimentos de silenciamiento de HIF-1 α .
3. Los oxisteroles están implicados en la liberación de endoglina soluble a través de la vía de LXR, ya que son capaces de aumentar la concentración de sEng actuando a tres niveles distintos. Los oxisteroles: i) aumentan los niveles de la endoglina de superficie celular; ii) aumentan la expresión en superficie de la metaloproteasa MMP-14, que actúa sobre endoglina; y iii) inhiben la expresión de TIMP-3, un inhibidor de MMP-14.
4. LXR modula el corte de endoglina, que da lugar a la liberación de la forma soluble, a través de la regulación de la expresión del inhibidor de metaloproteasas, TIMP-3. La activación de LXR produce una disminución de la expresión de TIMP-3, que conduce a la activación de MMP-14.
5. La metaloproteasa MMP-14 es la responsable del corte de la endoglina de membrana que da lugar a la liberación de la forma soluble de la misma en la línea celular Jar.
6. La activación de la vía de LXR, mediante la inyección de agonistas sintéticos o del oxisterol 22-R *in vivo* aumenta los niveles de endoglina soluble, que conlleva un aumento en la presión arterial de los animales.
7. El péptido bloqueante de endoglina P583 inhibe la liberación de endoglina soluble dependiente de oxisteroles e impide el aumento de presión arterial derivado de la misma en modelos animales. La co-inyección intravenosa de P583 con el oxisterol 22-R revierte el aumento de la presión arterial sistólica inducida por LXR. De estos resultados surge el mecanismo de liberación de sEng como una diana terapéutica para el tratamiento de la preeclampsia en mujeres embarazadas.

8. Puesto que los niveles elevados de sEng se asocian con un mal pronóstico en pacientes con tumores sólidos con metástasis y con mayor daño en órganos diana en pacientes con hipertensión o diabetes, estos estudios podrían servir también para entender la función de sEng en dichas patologías.

BIBLIOGRAFÍA

A-González N, Castrillo A. Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(8):982-994.

Abdalla, S. A. and Letarte, M. (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 43, 97-110.

Adam PJ, Clesham GJ, Weissberg PL: Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 247:33-37.

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(10):1634-1650.

Alt A, Miguel-Romero L, Donderis J, Aristorena M, Blanco FJ, Round A, Rubio V, Bernabeu C, Marina A. Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding. *PLoS One*. 2012;7(2):e29948.

Altomonte M, Montagner R, Fonsatti E, Colizzi F, Cattarossi I, Brasoveanu LI, Nicotra MR, Cattelan A, Natali PG, Maio M. Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. *Br J Cancer*. 1996;74:1586–1591.

Ansari, G.A., Walker, R.D., Smart, V.B., Smith, L.L. (1982). Further investigations of mutagenic cholesterol oxide preparations. *Food Chem Toxicol* 1982; 20: 35-41.

Arthur, H. M., Ure, J., Smith, A. J., Renforth, G., Wilson, D. I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D. V., Jowett, T., Marchuk, D. A. et al. (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 217, 42-53.

Aye IL, Waddell BJ, Mark PJ, Keelan JA. Oxysterols inhibit differentiation and fusion of term primary trophoblasts by activating liver X receptors. *Placenta*. 2011 Feb;32(2):183-91.

Ballegeer VC, Spitz B, De Baene LA, Van Assche AF, Hidajat M, Criel AM: Platelet activation and vascular damage in gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 166 :629– 633,1992

Baranowski M (2008) Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol* 59:31–55.

Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*. Jan 8;274(2):584-94.

Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderón F, Tuncali T, Tang W, Miller F, Mao R. (2006) A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am. J. Med. Genet. A*. 140: 2155-2162.

Bergh, N., Ulfhammer, E., Glise, K., Jern, S. and Karlsson, L. (2009). Influence of TNF-alpha and biomechanical stress on endothelial anti- and prothrombotic genes. *Biochem Biophys Res Commun* 385, 314-8.

- Bernabeu C, Conley BA, Vary CP. 2007. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem.* 2007 Dec 15;102(6):1375-88.
- Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792:954-973.
- Blanco, F. J., Grande, M. T., Langa, C., Oujo, B., Velasco, S., Rodriguez-Barbero, A., Perez-Gomez, E., Quintanilla, M., Lopez-Novoa, J. M., and Bernabeu, C. (2008). S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ. Res.* 103, 1383-1392.
- Blazquez-Medela AM, Garcia-Ortiz L, Gomez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JL, Sanchez-Rodriguez A, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Medicine* 2010;8:86.
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Ruth FX, Nagase H, et al. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;878:73-91
- Bodey B, Bodey B, Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. *Anticancer Res.* 1998;18:2701-2710.
- Bond M, Murphy G, Bennett MR, Amour A, Knauper V, Newby AC, Baker AH. (2000). *J. Biol. Chem.*, 275: 41358-41363.
- Bourdeau, A., Dumont, D. J. and Letarte, M. (1999). A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104, 1343-51.
- Bowen RS, Moodley J, Dutton MF & Theron AJ (2001) Oxidative stress in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 80(8): 719-725.
- Brand K, Baker AH, Perez-Canto A, Possling A, Sacharjat M, Geheeb M, Arnold W. (2000). *Cancer Res.*, 60: 5723-5730
- Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2010;1803(1):55-71.
- Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4823-30.
- Buhring HJ, Muller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmuller A, van Agthoven AJ, Busch FW. Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia* 1991;5:841-847.
- Burton GJ & Jauniaux E (2004) Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 11(6): 342-352.

Caniggia I, Taylor CV, Ritchie JW, Lye SJ, Letarte M. Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. *Endocrinology*. 1997;138(11):4977-4988.

Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solban N, Sako D, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar R, Grinberg AV. Soluble Endoglin Specifically Binds Bone Morphogenetic Proteins 9 and 10 via Its Orphan Domain, Inhibits Blood Vessel Formation, and Suppresses Tumor Growth. *J Biol Chem*. 2011;286(34):30034-30046.

Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JA & Madrid EM (2006) Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res* 39(2): 229–236.

Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. Sep 25;267(27):19027-30.

Cleaver, O. and Melton, D. A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9, 661-8.

Cole, SG, Begbie, ME, Wallace, GM et al. (2005). A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet*, 42: 577-582.

Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabéu C, Vary CP. 2004. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):27440-9.

Cruz-Gonzalez I, Pabón P, Rodríguez-Barbero A, Martín-Moreiras J, Pericacho M, Sánchez PL, Ramirez V, Sánchez-Ledesma M, Martín-Herrero F, Jiménez-Candil J, Maree AO, Sánchez-Rodríguez A, Martín-Luengo C, López-Novoa JM. 2008. Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2008 May-Jun;12(3):955-61.

Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Langa C, Rodriguez-Barbero A, Lopez-Novoa JM, Lamas S, Bernabeu C. 2002. Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. Volume 1587, Issue 1, 21 May 2002, Pages 36-44.

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *The FASEB Journal*. 2003;17:984-992.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174.

Edwards P. A., Kast H. R., Anisfeld A. M. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res*. 2002;43:2–12.

Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, et al. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med*. 2001;344:867–72.

Faughnan M E, Palda V A, Garcia-Tsao G, et al. International guidelines for the diagnosis and management of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet.* 2011;48(2):73–87.

Fernandez-Ruiz, E., St-Jacques, S., Bellon, T., Letarte, M. and Bernabeu, C. (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet* 64, 204-7.

Fernandez, L. A., Sanz-Rodriguez, F., Blanco, F. J., Bernabeu, C. and Botella, L. M. (2006). Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res* 4, 66-78.

Fisher SJ (2004) The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 53.

Foidart JM, Schaaps JP, Chantraine F, Munaut C, Lorquet S. Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia-a step forward but not the definitive answer. *J Reprod Immunol.* 2009;82(2):106-111.

Fonsatti E, Nicolay HJ, Altomonte M, Covre A, Maio M. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc Res.* 2010;86(1):12-19.

Fournier T, Handschuh K, Tsatsaris V, Guibourdenche J, Evain-Brion D. Role of nuclear receptors and their ligands in human trophoblast invasion. *J Reprod Immunol.* 2008;77(2):161-170.

Fuchizaki U, Miyamori H, Kitagawa S, Kaneko S, Kobayashi K. 2003. Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease). *The Lancet* , Volume 362 , Issue 9394 , Pages 1490 – 1494.

Gallione, C. J., Repetto, G. M., Legius, E., Rustgi, A. K., Schelley, S. L., Tejpar, S., Mitchell, G., Drouin, E., Westermann, C. J. and Marchuk, D. A. (2004). A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* 363, 852-9.

Gimbrone, M. A., Jr., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R. and Garcia-Cardena, G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 902, 230-9; discussion 239-40.

Goldberg, M. A., Dunning, S. P. and Bunn, H. F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242, 1412-5.

Goligorsky, M. S. (2000). Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney Int* 58, 1360-76.

Gougos A., Letarte M. 1988. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J. Immunol.* 141: 1925-1933.

Gougos A, Letarte M (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265: 8361–8364.

- Gougos A, St-Jaques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJF, Bühring HJ, Bernabéu C, van Mourik JA, Letarte M. 1992. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblast. *Int. Immunol.* 4:83-92.
- Goumans, M. J. and Mummery, C. (2000). Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 44, 253-65.
- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. and ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J* 21, 1743-53.
- Govani, F. S. and Shovlin, C. L. (2009). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet.*
- Gresele, P., Momi, S. and Migliacci, R. (2010). Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb Haemost* 103, 56-61.
- Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, et al. (1999) Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 78: 614–623.
- Guerrero-Esteo M, Sánchez-Elsner T, Letamendía A, Bernabéu C. 2002. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-β receptors I and II. *J. Biol. Chem.* 32:29197-29209.
- Guttmacher, A. E., Marchuk, D. A. and White, R. I., Jr. (1995). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 333, 918-24.
- Hack, C. E. and Zeerleder, S. (2001). The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* 29, S21-7.
- Hagmann H, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA, Stepan H. The promise of angiogenic markers for the early diagnosis and prediction of preeclampsia. *Clin Chem.* 2012 May;58(5):837-45.
- Hanes, F. (1909). Multiple hereditary telangiectases causing hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia). *Johns Hopkins Hospital Bulletin* 20, 63-73.
- Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF, ten Dijke P. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2010;70(10):4141-4150.
- Henry-Berger J, Mouzat K, Baron S, Bernabeu C, Marceau G, Saru JP, Sapin V, Lobaccaro JM, Caira F. 2008. Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biol Reprod.* 2008 Jun;78(6):968-75.
- Hoe HS, Cooper MJ, Burns MP, Lewis PA, van der Brug M, Chakraborty G, Cartagena CM, Pak DT, Cookson MR, Rebeck GW. 2007. The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid

precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. *J Neurosci.* 2007 Oct 3;27(40):10895-905.

Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, et al. (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 266–271.

Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 2000;157:2111–22.

Jerkic M, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carrón R, Sanz-Rodríguez F, Pérez-Barriocanal F, Rodríguez-Barbero A, Bernabéu C, López-Novoa JM. 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* 2004 Mar;18(3):609-11.

Johnson, D. W., Berg, J. N., Baldwin, M. A., Gallione, C. J., Marondel, I., Yoon, S. J., Stenzel, T. T., Speer, M., Pericak-Vance, M. A., Diamond, A. et al. (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 13, 189-95.

Jones, N., Iljin, K., Dumont, D. J. and Alitalo, K. (2001). Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 257-67.

Kang KH, Park SY, Rho SB, Lee JH (2008) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79: 150–60.

Ke, Q. and Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70, 1469-80.

Kubow, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Rad Biol Med* 1992; 12: 63-81.

Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, et al. (1992) Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22: 393–397.

Lastres P, Martin-Perez J, Langa C, Bernabeu C (1994) Phosphorylation of the human transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J* 301: 765–768.

Lastres P, Letamendía A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, López LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabéu C. 1996. Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. *J. Cell Biol.* 133:1109-1121.

Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C. 1998. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem.* Dec 4;273(49):33011-9.

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group. 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006 Sep 7;355(10):992-1005.

- Li, D. Y., Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Urness, L. D., Davis, E. C., Taylor, D. G., Boak, B. B. and Wendel, D. P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534-7.
- Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S. 2000. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 2000 Mar 20;89(2):122-6.
- Liston WA, Kilpatrick DC. Is genetic susceptibility to preeclampsia conferred by homozygosity for the same single recessive gene in mother and fetus? *Br J Obstet Gynaecol*. 1991;98:1079-86.
- Liu Y, Jovanovic B, Pins M, Lee C, Bergan RC. Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. *Oncogene*. 2002;21:8272-81.
- Liu W, Shen SM, Zhao XY, Chen GQ. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(2):165-78.
- López-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(4):H959-974.
- Lopez-Otin C., Palavalli L. H., Samuels Y. (2009). Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. *Cell Cycle* 8, 3657-3662. doi: 10.4161/cc.8.22.9956.
- Manalo, D. J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B. D., Ye, S. Q., Garcia, J. G. and Semenza, G. L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105, 659-69.
- Mano Y, Kotani T, Shibata K, Matsumura H, Tsuda H, Sumigama S, Yamamoto E, Iwase A, Senga T, Kikkawa F. The Loss of Endoglin Promotes the Invasion of Extravillous Trophoblasts. *Endocrinology*. 2011;152(11):4386-4394.
- Maerker, G. Cholesterol autoxidation-Current status. *J Am Oil Chem Soc* 1987; 64: 388-392.
- Marceau G, Volle DH, Gallot D, Mangelsdorf DJ, Sapin V, Lobaccaro JM. Placental expression of the nuclear receptors for oxysterols LXRalpha and LXRbeta during mouse and human development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005;283:175-181.
- Maskos K: Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* 2005, 87:249-263.
- Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* 19, 2783-810.
- Matsubara S, Bourdeau A, Terbrugge KG, Wallace C, Letarte M. 2000. Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. *Stroke* 31:2653-2660.

McAllister, K. A., Grogg, K. M., Johnson, D. W., Gallione, C. J., Baldwin, M. A., Jackson, C. E., Helmbold, E. A., Markel, D. S., McKinnon, W. C., Murrell, J. et al. (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8, 345-51.

McDonald, M. T., Papenberg, K. A., Ghosh, S., Glatfelter, A. A., Biesecker, B. B., Helmbold, E. A., Markel, D. S., Zolotor, A., McKinnon, W. C., Vanderstoep, J. L. et al. (1994). A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34. *Nat Genet* 6, 197-204.

Merill, A.H.. Lipid modulation of cell function. *Nutr Rev* 1989; 47: 161-169.

Merviela P, Carbillon L, Challierb J-C, Rabreaud M, Beaufilse M, Uzan S. Pathophysiology of preeclampsia: links with implantation disorders. Review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;115:134-47.

Meurer S K, Tihaa L, Lahme B. et al Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor β receptor signaling. *J Biol Chem* 2005. 2803078-3087.3087.

Mole, D. R., Blancher, C., Copley, R. R., Pollard, P. J., Gleadle, J. M., Ragoussis, J. and Ratcliffe, P. J. (2009). Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 284, 16767-75.

Morel, D., Yi Lin, C. Cellular biochemistry of oxysterol derived from the diet or oxidation in vivo. *Nut Biochem* 1996; 7: 495-506.

Mouzat K, Mercier E, Polge A, Evrard A, Baron S, Balducchi JP, Brouillet JP, Lumbroso S, Gris JC. A common polymorphism in NR1H2 (LXRbeta) is associated with preeclampsia. *BMC Med Genet*. 2011;12:145.

Murphy RC, Johnson KM. Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *J Biol Chem*. 2008;283(23):15521-15525.

O'Connell PJ, McKenzie A, Fisticaro N, Rockman SP, Pearse MJ, d'Apice AJ. Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* 1992;90:154-159.

Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S. et al. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2626-31.

Parker WL, Goldring MB, Philip A. Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGF β receptor independent manner. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2003;18(2):289-302.

Pavan L, Hermouet A, Tsatsaris V, Thérond P, Sawamura T, Evain-Brion D, Fournier T. Lipids from oxidized low-density lipoprotein modulate human trophoblast invasion: involvement of nuclear liver X receptors. *Endocrinology*. 2004;145(10):4583-4591.

Pérez-Gómez E, Villa-Morales M, Santos J, Fernández-Piqueras J, Gamallo C, Dotor J, Bernabéu C, Quintanilla M. 2007. A role for endoglin as a suppressor of malignancy during mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10268-77.

Piek, E., Heldin, C. H. and Ten Dijke, P. (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *Faseb J* 13, 2105-24.

Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation.* 2011;123(24):2856-2869.

Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M. and Ratcliffe, P. J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272, 11205-14.

Raab U, Lastres P, Arevalo MA, Lopez-Novoa JM, Cabanas C, de la Rosa EJ, Bernabeu C. Endoglin is expressed in the chicken vasculature and is involved in angiogenesis. *FEBS Lett* 1999;459:249-254.

Reno F, Sabbatini M, Stella M, Magliacani G, Cannas M. Effect of in vitro mechanical compression on Epilysin (matrix metalloproteinase-28) expression in hypertrophic scars. *Wound Repair Regen.* 2005;13:255-61. doi: 10.1111/j.1067-1927.2005.130307.x

Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002; 277: 18793-800

Roberts, A. B. and Sporn, M. B. (1993). Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 8, 1-9.

Roberts JM: Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 16 :5- 15,1998

Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P, Arroyo AG, Bernabeu C, Sanchez-Madrid F, Teixido J. Characterization of TGF- β 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. *Br J Haematol* 1996;93:507-514.

Rodriguez-Barbero, A., Obreo, J., Eleno, N., Rodriguez-Pena, A., Duwel, A., Jerkic, M., Sanchez-Rodriguez, A., Bernabeu, C., and Lopez-Novoa, J.M. (2001). Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 142-147.

Rokhlin O W, Cohen M B, Kubagawa H, Letarte M, Cooper M D. Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol* 1995; 154: 4456-4465

Sánchez-Elsner T, Botella L. M., Velasco B., Langa C., Bernabéu C. (2002). Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 43799-43808. doi: 10.1074/jbc.M207160200.

Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β / TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci*. 2011;121:233–51.

Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabéu C. 2004. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, Issue 31, 32858-32868.

Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Löwik CW, ten Dijke P. 2007. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*. 2007 Mar 15;120(Pt 6):964-72.

Schmierer, B. and Hill, C. S. (2007). TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 970-82.

Schroepfer GJ., Jr Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev*. 2000;80:361–554.

Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14(22):2831-288.

Scott J. 2007. The liver X receptor and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med*. 357: 2195–2197.

Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 588-94.

Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. and Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 32529-37.

Semenza, G. L., Neifelt, M. K., Chi, S. M. and Antonarakis, S. E. (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-4.

Shovlin, C. L., Hughes, J. M., Tuddenham, E. G., Temperley, I., Perrebelon, Y. F., Scott, J., Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (1994). A gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q3. *Nat Genet* 6, 205-9.

Shovlin, C. L., Gutmacher, A. E., Buscarini, E., Faughnan, M. E., Hyland, R. H., Westermann, C. J., Kjeldsen, A. D. and Plauchu, H. (2000). Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 91, 66-7.

Shovlin C. L. (2010). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev*. 24, 203–219. doi: 10.1016/j.blre.2010.07.001.

Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S, Post M, Caniggia I. Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2005;90:4299-42308.

- Spector, A.A., Yorek, M.A. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 1985; 26: 1015-1035.
- Stamenkovic, I. 2003. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 200:448-464.
- St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M. 1994. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor- α binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 134:2645-2657.
- Steck TL, Lange Y. Cell cholesterol homeostasis: Mediation by active cholesterol. *Trends in Cell Biology.* 2010;20:680–687.
- Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal.* 2008;1:re6.
- ten Dijke, P. and Arthur, H. M. (2007). Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 857-69.
- ten Dijke, P., Goumans, M. J. and Pardali, E. (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11, 79-89.
- Vasala K, Pääkkö P & Turpeenniemi-Hujanen T (2008) Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) immunoreactive protein in urinary bladder cancer: A marker of favourable prognosis. *Anticancer Res* 28(3B): 1757–1761.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 2006 Jun;12(6):642-9.
- Verhaar MC, Rabelink TJ. The endothelium: a gynecological and obstetric point of view. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 Feb;94(2):180-5.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. and Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-4.
- Walsh SW. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;152:335–40.
- Walsh SW, Wang Y. Deficient glutathione peroxidase activity in preeclampsia is associated with increased placental production of thromboxane and lipid peroxides. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 169: 1456–1461.
- Wautier, J. L. and Schmidt, A. M. (2004). Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* 95, 233-8.
- Weedon-Fekjaer MS, Duttaroy AK, Nebb HI. Liver X receptors mediate inhibition of hCG secretion in a human placental trophoblast cell line. *Placenta.* 2005;26:721-728.

Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A. 2000. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells. Association with betaglycan and formation of higher order complex with TGF- β signalling receptors. *Eur. J. Biochem.* 267:5550-5560.

Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS (2003) Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Bio* 36: 128–137

Zhang H, Shaw ARE, Mak A, Letarte M. 1996. Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)- β receptor complex of human pre-B leukemic cells. *J. Immunol.* 156:565-573.

Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. 1999 A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400, 687–6