FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN VASCULAR

EFECTO DE HOMOCISTEINA SOBRE LA MIGRACIÓN INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR NICOTíNICO α7 EN ENDOTELIO HUMANO

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

SAILOR ANDRÉS FOSTER VARAS

Director de Tesis: Magdalena Cortés Saavedra

ENERO 2019

Heúreka!!!

Arquímides de Siracusa

Agradecimientos

Debo partir agradeciendo a mis padres Rosa y Guillermo por haber sacrificado tanto tiempo a mi crianza y educación, entregando todo de si mismos, para poder otorgar todas las herramientas posibles y haber logrado darme oportundades en la vida que muchas personas no tienen la suerte de obtener, les estoy inmensamente agradecido por todo el amor que me han entregado. A mis hermanos Ewan y Dylan, quienes a pesar de no entender mucho mi trabajo en el laboratorio siempre me escuchan y me apoyan cuando me encuentro estresado o triste. A mi familia completa Margarita, Guillermo, Maria Eugenia, Carola, Paola, Claudia y en especial Veronica y Ferando por que me han cuidado, alimentado, apoyado, escuchado, amado durante toda mi vida y siempre han estado ahi cuando los he necesitado.

A mis amigos que he logrado hacer y mantener en la Universidad Francisco y Juan, amigos desde los primeros años de esta larga incursion, por haberme levantado el animo cuando no podia más, por las cervezas compartidas y tardes de cine. A Maximiliano eterno compañero academico y laboratorio, por escuchar mis descargos y compartir tu tiempo. Paulina por esos cafes conversados y tertulias de la vida. A mis colegues Jonathan, Sebastian, Patricio, Claudia por tantos memes y momento compartidos.

A los profesores de la Facultad de Farmacia UV, quienes me han formado durante estos años, entregado tiempo y conversaciones, que me han ayudado a madurar tanto en lo profesional como en lo personal.

A la profesora Magdalena Cortés quien me recibio en segundo año, me formo, me entrego herramientas, me enseño que la ciencia debe construirse en base a la seriedad, constancia, analisis exhaustivo, que no bajar los brazos siempre tiene recompenza, profesora no tengo palabras (que extraña situacion) para expresar lo agradecido que estoy con usted. A la profesora Leticia Luna, quien desde la primera asignatura en la que nos encontramos, me ha enseñado a decir lo justo y necesario, por las conversaciones y su amabilidad. Al profesor Gonzalo Cruz y Carolina Campos por sus correcciones, que desde la formulación del proyecto de tesis me ayudaron incluso a adjudicar un convenio de desempeño para el desarrollo de la presente tesis.

A mi equipo de trabajo Evelyn, quien me ayudo en muchas ocasiones facilitando y amenisando el ambiente del laboratorio. A Carolina quien escuchaba mis penurias, aconsejaba cuando fue necesario. A Karla, a pesar del poco tiempo que disponia fue un gran aporte. A Hilda quien me formo al igual que la profesora Cortés, desperto mi interes por la ciencia, por tu tiempo, correcciones desde segundo año de la carrera.

A la matrona Lucia Madrid, por su maravillosa disposicion, amabilidad y colaboracion, sin su apoyo hubiese sido imposible desarrollar la presente tesis. Al hospital Carlos Van Buren, en especifico al Servicio de Ginecologia y Obstetricia por permitir la colaboracion con nuestro laboratorio

Finalmente y el más importante, a Patricia por su disposición y disponibilidad para ejecutar el proyecto y al convenio de desempeño UVA 1402 el cual posibilito el desarrollo de esta tesis.

RESUMEN

Introducción: La hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para las enfermedades cardiovasculares, principal causa de mortalidad en Chile. Se ha demostrado que concentraciones elevadas de homocisteína (Hcy) inhiben la angiogénesis, proceso en donde los receptores nicotínicos de acetilcolina no neuronales, específicamente el receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 (α7-nAChR), cumple un rol clave. **Objetivo:** Evaluar el efecto de Hcy sobre la migración inducida por la activación del α7-nAChR en células endoteliales humanas. **Metodología:** Para evaluar la migración celular, se utilizó el ensayo de lesión en monocapa celular en cultivo primario de células endoteliales obtenida de vena de cordón umbilical humano (HUVEC, en inglés) preincubadas por un periodo de 24 horas con diferentes niveles de Hcy (0, 10, 50, 100 y 500 µM). Para inducir la migración celular se utilizó la herramienta farmacológica, colina, agonista selectivo de α7-nAChR. **Resultados:** Hcy (10, 50 y 100 µM) no presentó diferencia estadisticamente significativa respecto al control (sin Hcy) sobre la migración de HUVEC, mientras Hcy (500 µM) se eliminó del estudio, debido a la drástica disminución de la densidad celular. Hcy 50 µM (10,9 ± 1,4%) y 100 µM (6,6 ± 0,3%), disminuyen significativamente ($p<0,001$, para ambas) el porcentaje de área repoblada por HUVECs inducida por colina, respecto al control positivo (25,7 ± 2,7%). **Conclusiones:** Hcy a concentraciones equivalente a niveles plasmáticos relevantes *in vivo* es capaz de reducir la migración celular en HUVECs inducido por la activación selectiva del α7-nAChR. Estos resultados abren la puerta a futuros

estudios que permitirán comprender los mecanismos antiangiogénicos de Hcy sobre la señalización mediada por la activación del α7-nAChR, y así posicionar al mismo como una posible diana farmacológica en la inducción de angiogénesis en condiciones de altas concentraciones de Hcy.

ABSTRACT

Introduction: “Hyperhomocysteinemia is an independent risk factor for cardiovascular diseases, which are the principal cause of mortality in Chile. It has been shown that elevated concentration of homocysteine (Hcy) inhibits angiogenesis, process where the α7 nicotinic acetylcholine receptor (α7 nAChR) plays a crucial rol. **Objective:** Assess the effect of Hcy on migration induced by the activation of α7 nAChR in human endothelial cells. **Methodology:** To assess cell migration, the wound healing assay was performed on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), wich were incubated by 24 h with different concentrations of Hcy (0, 10, 50, 100 y 500 µM). To induce the cell migration choline, selective agonist of α7 nAChR, was used as a pharmacological tool. **Results:** The group incubated with 500 µM was eliminated from this study due to the dramatic decrease in cell density previous to perform the wound healing assay. Hcy (10, 50 y 100 µM) had no effect on cell migration alone. Hcy 50 µM (10,9 ± 1,4%) and 100 µM (6,6 ± 0,3%), significantly reduce ($p<0,001$, for both) the percentage of area repopulated by HUVEC induced by choline compared to the positive control (25,7 ± 2,7%). **Conclusions:** Hcy at concentration equivalent to important plasma levels *in vivo* is able to reduce the cell migration in HUVEC induced by selective activation of the α7-nAChR. This results opens a door for future studies that will allow to understand tha antiangiogenic mechanism of Hcy on the signaling mediated by the activation of α7-nAChR, and thus position it as a possible pharmacological target in the induction of angiogenesis in condition of high concentrations of Hcy.

INDICE

INTRODUCCIÓN 1
HIPÓTESIS 4
OBJETIVOS 5
MATERIALES Y MÉTODOS 6
RESULTADOS 10
DISCUSIÓN 16
CONCLUSIÓN 20
REFERENCIAS 21
ANEXO 23

INTRODUCCIÓN

En los años recientes el término homocisteína (Hcy) ha cobrado gran importancia, este hecho se debe a que numerosos estudios clínicos y epidemiológicos evidencian que los niveles elevados de homocisteína en plasma, hiperhomocisteinemia (HHcy), estarían asociados al desarrollo de enfermedades ateroescleróticas y otras enfermedades cardiovasculares (ECV) (Genoud y Quintana., 2016; Pan *y* cols., 2017; Zhang *y* cols.,2012; Chrysant S y Chrysant G., 2018) mediante disminución en el aporte del flujo de sangre y con ello una disminución del aporte de oxígeno a los tejidos. A nivel nacional las ECV son la principal causa de mortalidad, con un total de 27% de 104.026 defunciones en el año 2016 (INE., 2018).

Diversos factores genéticos, nutricionales y otros tales como el sexo, la edad de los individuos, ciertas drogas y patologías son condicionantes de los niveles de Hcy plasmáticas (Genoud y Quintana, 2016). La interacción entre estos puede inducir a una HHcy, las cuales se han definido en tres niveles, moderada (16-30 µM), intermedia (31 -100 µM) y severa (>100 µM) (Genoud y Quintana, 2016). Las concentraciones elevados de Hcy en plasma han sido asociadas a generación de estrés oxidativo, siendo tóxicas para el endotelio, desencadenando la disfunción endotelial y responsable de las enfermedades vasculares oclusivas (Mujumdar *y cols*., 2001; Weiss, 2005; Tyagi *y cols*., 2005). En un modelo experimental *in vivo* de HHcy moderada, se ha demostrado que ésta alteraría la función de las enzimas

necesarias para la disrupción de la matriz para generar nuevos vasos sanguíneos o vasos colaterales a partir de vasos preexistentes, proceso dinámico denominado angiogénesis (Kundu *y cols.*, 2009). Un segundo estudio, en modelo *in vitro* e *in vivo*, demostró que concentraciones moderadas de Hcy serían capaces de inhibir la migración de las células endoteliales (CE), formación de estructuras tubulares y formación de vasos sanguíneos (Pan *y cols*., 2017). A la fecha, existen estos dos estudios que asocian la HHcy con una inhibición del proceso de angiogénesis.

En virtud de los antecedentes expuestos, la correcta revascularización en pacientes con enfermedades vasculares oclusivas, es de interés investigar a nivel de salud pública y ciencia básica la participación de nuevas moléculas dianas, destacándose el receptor nicotínico de acetilcolina alfa 7 (α7-nAChR) por su rol clave en la angiogénesis (Heeschen y cols., 2002; Li y Wang, 2005; Arias y cols, 2009). La angiogénesis contempla las etapas de migración, proliferación y supervivencia celular, involucrados en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de aquellos preexistentes (Wu *y cols*., 2009). En modelo *in vitro*, cultivo de endotelio humano incubado con un antagonista no selectivo de los nAChR, se ha observado que disminuye la formación de estructuras tubulares en un 50% respecto al control. El mismo porcentaje de inhibición, se obtuvo con un antagonista selectivo del α7-nAChR, a una concentración diez veces menor (Heeschen *y cols*., 2002), lo cual demuestra la importancia del receptor α7-nAChRs en el proceso de angiogénesis. En ese sentido, existen otros estudios que confirman su rol clave, usando un agonista selectivo del α7-nAChR, quien ha demostrado estimular la angiogénesis en modelos *in vitro* e *in vivo* (Li y Wang, 2007; Jin *y cols.*, 2015;

Krupinski *y cols.*, 2012). Sin embargo, a la fecha no existen estudios que evalúen si altas concentraciones de Hcy serían capaz de alterar la angiogénesis inducida por la activación del α7-nAChR.

En la presente tesis, se utilizó el modelo in vitro de cultivo primario de células endoteliales aisladas de vena de cordón umbilical (en inglés, HUVEC) de embarazo sano, por poseer mayor expresión de la isoforma del α7-nAChR cuando las HUVEC se encuentran en proliferación, isoforma de nAChR con mayor participación en la angiogénesis (Heeschen *y cols*, 2002; Wu *y cols*, 2009). Sumado a lo anterior, el cultivo primario de células endoteliales de origen humano permite cultivar células que mantienen las características nativas, lo cual es un factor importante cuando se espera obtener resultado semejante *in vivo*. Por ello, este modelo celular es ampliamente utilizado para evaluar procesos implicados en la angiogénesis como proliferación, migración y formación de estructuras tubulares. De estos, se evaluó la migración celular utilizando el "ensayo de lesión de monocapa celular" que consiste en remover de forma mecánica una región del monocapa celular confluente, y luego evaluar cómo las células de la región intacta migran hacia la región desnuda, a fin de repoblar la zona (Liang *y cols*., 2007).

HIPÓTESIS

Hcy inhibe la migración inducida por la activación selectiva del α7-nAChR, en células endoteliales humanas, de forma concentración dependiente

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de Hcy sobre la migración inducida por la activación de los α7-nAChR en HUVEC.

Especifico

1. Describir el efecto de Hcy sobre la migración de HUVEC, usando el ensayo de lesión en monocapa
2. Analizar el efecto de Hcy sobre la migración de HUVEC, del experimento anterior
3. Describir el efecto de Hcy sobre la migración de HUVEC inducido por la α7-nAChR, usando el ensayo de lesión en monocapa y la herramienta farmacológica, colina
4. Analizar el efecto de Hcy sobre la migración de HUVEC inducido por la α7-nAChR, del experimento anterior.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. - HEPES ácido, gelatina, , medio de cultivo 199 (M199), penicilina/estreptomicina, tripsina 0,05%, L- glutamina, D-glucosa y suero Fetal Bovino (SFB) de Gibco (Grand Island, NY, USA).

- Azul de tripán 0,4% Colagenasa tipo I, colina y DL-Homocisteina de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

Cultivo de HUVEC. Los cordones umbilicales fueron recolectados de embarazos sanos de término (38-42 semanas), desde la unidad Gineco-Obstétrica del Hospital Carlos Van Buren, previa aprobación del Comité de Ética (anexo-1, anexo-2) y el consentimiento informado de las madres (anexo-3).

A partir de 2 a 3 cordones se obtuvo un pool de células endoteliales, las cuales fueron aisladas por digestión de colagenasa tipo I (0,5 mg/mL) desde la vena del cordón umbilical (Jaffe y cols. 1973), cultivadas en M199 (suplementado con L-glutamina (2,5 mM), Hepes-ácido (14 mM), penicilina (200 UI/mL), estreptomicina (400 UI/mL) y suero fetal bovino (SFB) 20%, e incubadas a una temperatura de 37°C. Una vez que las HUVEC alcanzaron un 80-90% de confluencia, se traspasaron a placas de cultivo celular de 96 pocillos para realizar el ensayo de lesión en monocapa celular.

Preincubación y ensayo de lesión de monocapa celular. El ensayo fue realizado en tres experimentos independientes, y por triplicado en cada placa.

Para determinar el efecto propio de Hcy sobre la migración celular, se realizó el siguiente protocolo (Figura 1):

Etapa de preincubacion:

1. Las HUVEC se sembraron a una densidad de $2x10^4$ células/pocillo en M199 suplementada con 10% SFB (M199-10x), por un periodo de 24 h.
2. Al término de ese tiempo, las HUVEC son incubadas con diferentes concentraciones de Hcy (0, 10, 50, 100, 500 µM) en M199 suplementada con 5% SFB (M199-5x), por otro periodo de 24 h.

Ensayo de lesión en monocapa:

3. Finalizado ese tiempo, se efectúa la lesión mecánica en la monocapa celular, y se incuban las células por 24 horas a 37°C utilizando como control positivo, el agonista selectivo del α7-nAChR, colina, a una concentración 10 µM en M199-5x y como control negativo M199-5x. La incubación con Hcy se realiza en dos grupos: uno con diferentes concentraciones (0, 10, 50, 100, 500 µM) en M199-5x y otro incubado con las concentraciones de Hcy ya mencionadas junto con 10 µM colina en M199-5x (Tabla 1).
4. Para evaluar la migración, se fotografió la herida al tiempo 0, y a las 24 h, ésta última con el objetivo de capturar la imagen de las células movilizadas hacia el área desnuda, fotografiando un total de tres campos por pocillo, con un objetivo 10x (Microscopio invertido XDS-1A).

5. Las áreas superficiales de las células migradas fueron analizadas utilizando el software ImageJ (ImageJ 1.47v), y el porcentaje de área superficial repoblada se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Liang *y cols.*, 2007; Schneider y col., 2012):

$$\textbf{\%Área Repoblada} = \frac{(\textbf{Área}_{t=0hr} - \textbf{Área}_{t=\Delta hrs})}{(\textbf{Área}_{t=0hr})} \times 100\%$$

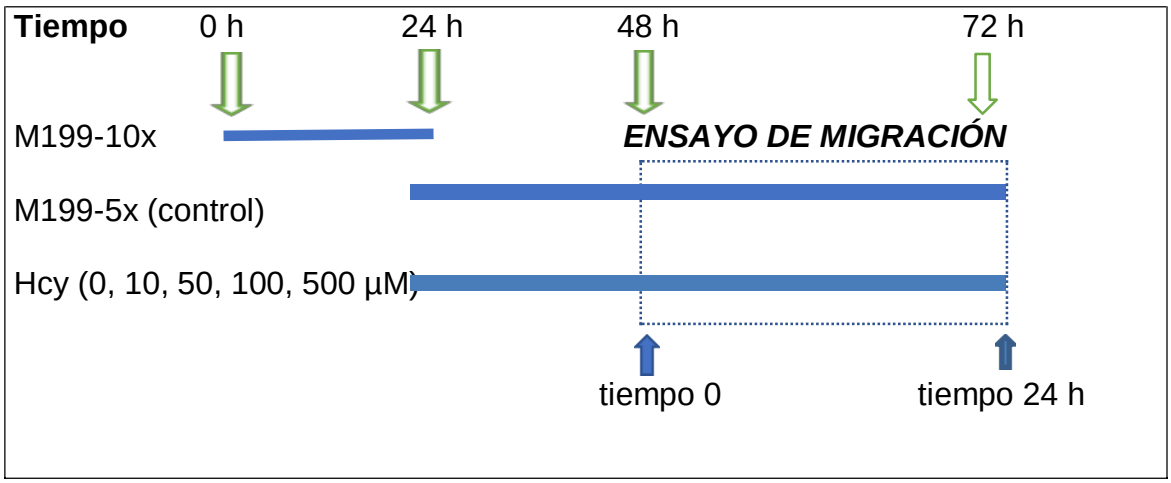

Figura 1. Tiempos de pre incubación y ensayo de lesión en monocapa

Tabla 1. Diseño experimental

	Grupos:	PREPARACIÓN De 0 a 24 h	PREPARACIÓN De 24 a 48h	ENSAYO LESIÓN de 48 a 72 h (t0 y t24 ensayo)
1	Control	M199-10x	M199-5x + 0 µM Hcy	M199-5x
2	Control positivo			M199-5x + 10µM colina
3	Hcy1		M199-5x + 10 µM Hcy	M199-5x + 10 µM Hcy + 10µM colina
4	Hcy2			M199-5x + 10 µM Hcy
5	Hcy3		M199-5x + 50 µM Hcy	M199-5x + 50 µM Hcy + 10µM colina
6	Hcy4			M199-5x + 50 µM Hcy
7	Hcy5		M199-5x + 100 µM Hcy	M199-5x + 100 µM Hcy + 10µM colina
8	Hcy 6			M199-5x + 100 µM Hcy
9	Hcy 7		M199-5x + 500 µM Hcy	M199-5x + 500 µM Hcy + 10µM colina
10	Hcy 8			M199-5x + 500 µM Hcy

Análisis estadístico. Los resultados fueron expresados como el promedio ± Error estándar de la media (X ± SEM). La distribución normal de los datos se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk. Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron analizadas mediante la prueba estadística ANOVA, seguido del test post hoc Holm-Sidak. Se empleó como criterio indicador de diferencia estadísticamente significativa un valor de $p<0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software SigmaPlot 14.0 (Systat Software, Inc)

RESULTADOS

Las HUVEC incubadas con Hcy (10 y 50 µM) durante un periodo de 24 h, formaron una monocapa en confluencia al 80%, la cual disminuyó gradualmente a medida que aumentaba la concentración de Hcy, siendo ésta drástica con 500 µM (figuras no mostradas). Cumplido el tiempo para realizar la lesión mecánica en la monocapa, se decidió descartar el grupo incubado con 500 µM Hcy del estudio, debido a la importante disminución de la densidad celular.

En la Fig. 2 se muestran las imágenes representativas del efecto de Hcy sobre la migración celular, observándose que aquellas incubadas con 10, 50 y 100 µM Hcy, migraron en forma similar a la condición control (sin Hcy), a diferencia del mayor cierre de la herida inducido por el control positivo (10 µM colina). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las HUVEC incubadas con diferentes concentraciones de Hcy, ni éstas respecto al control. El porcentaje de área superficial repoblada fue: 3,1 ± 1,2% (control), 5,2 ± 0,8% (10 µM Hcy), 2,9 ± 1,5 (50 µM Hcy), 2,4 ± 0,8% (100 µM Hcy), y 25,7 ± 2,7% (control positivo colina), éste último con diferencias estadísticamente significativas con todos los otros grupos ($p < 0,001$) (Fig. 3). Indicando que no hay efecto de Hcy por si misma sobre la migración celular.

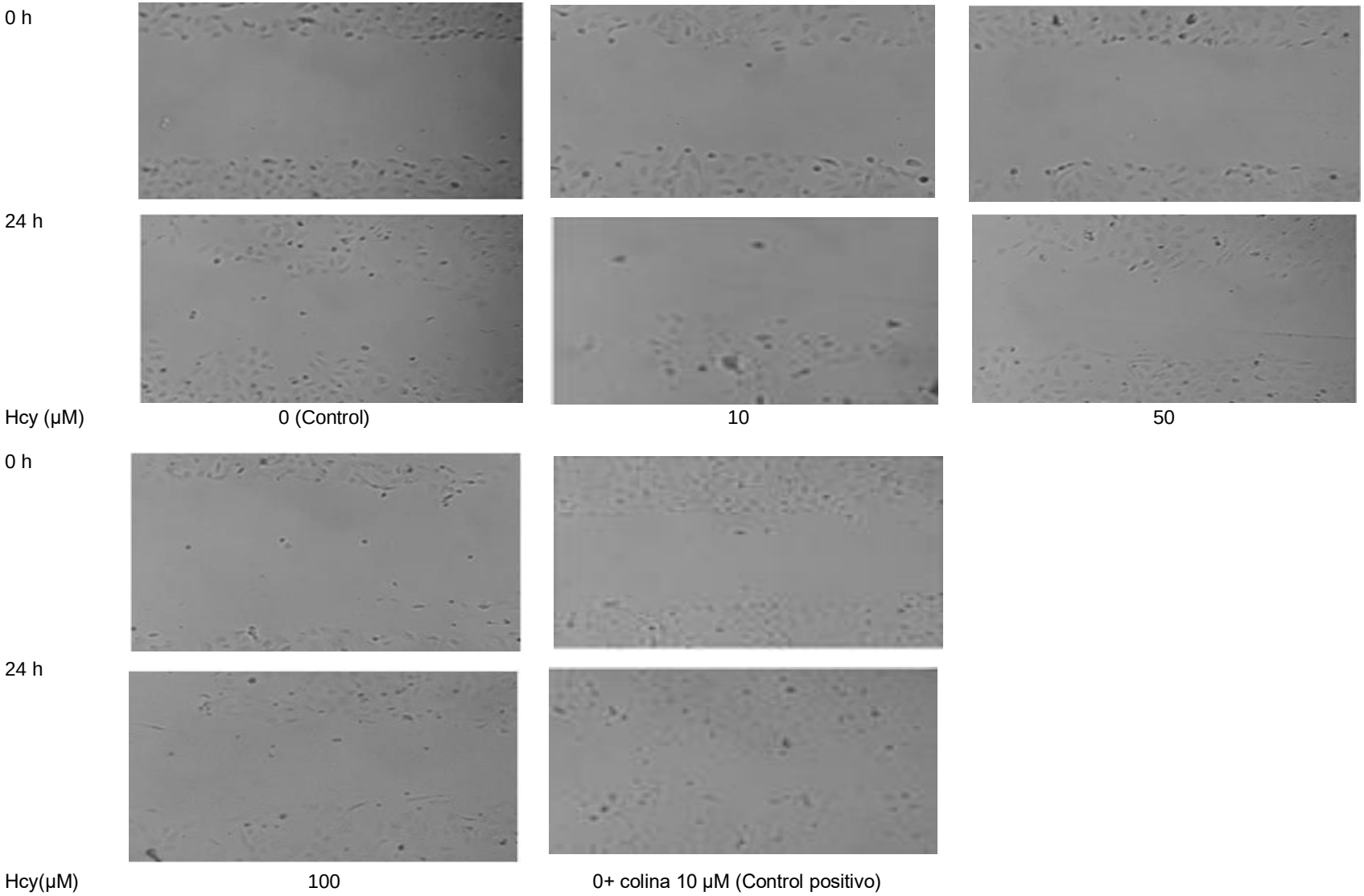

Figura 2. Efecto de Hcy sobre la migración de HUVEC. Imágenes representativas de ensayo de lesión de monocapa celular, a las 0 y 24 h, de HUVEC incubadas con Hcy a concentraciones crecientes en M199-5X, M199-5X (control), o colina 10-5 M en M199-5x (control positivo).

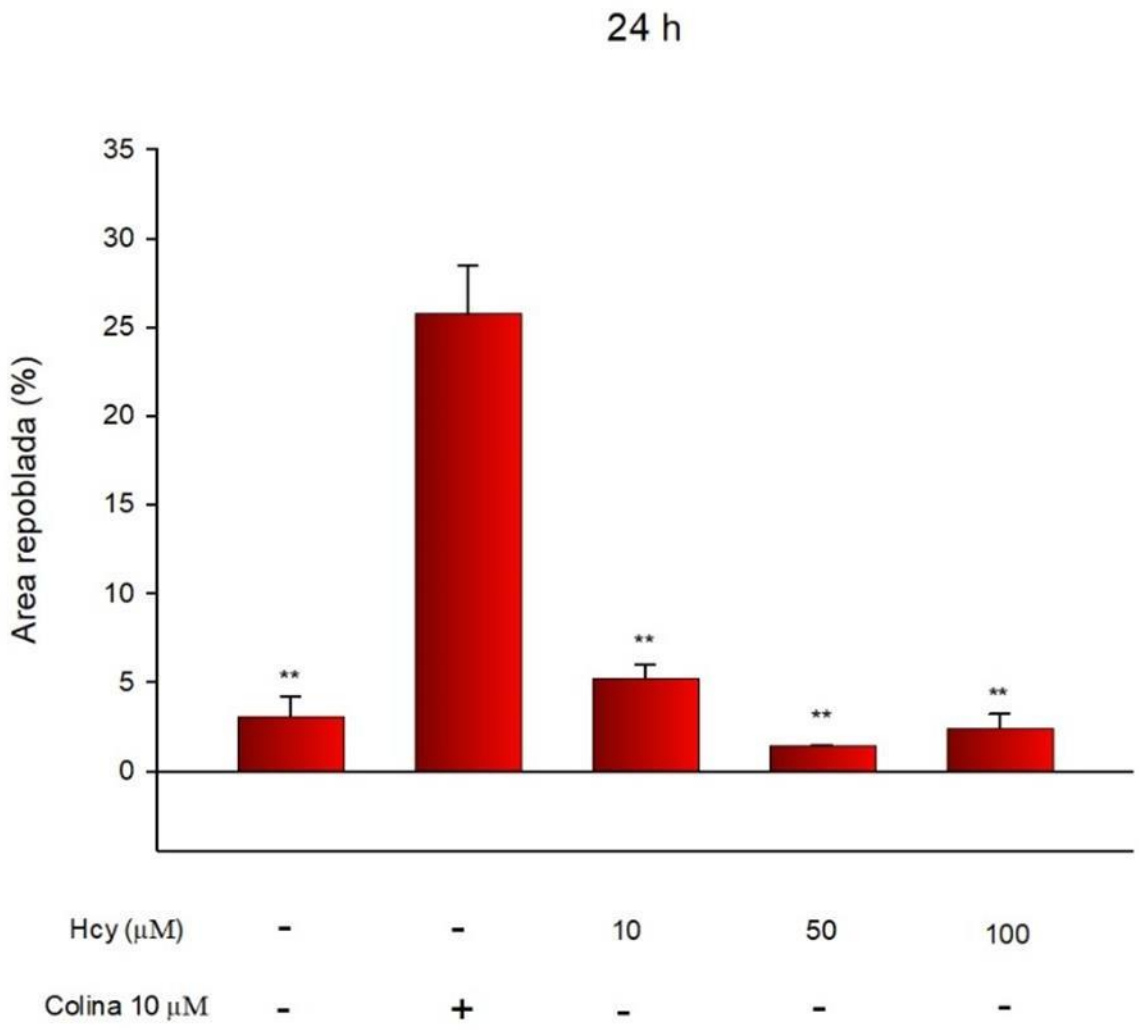

Figura 3. Efecto propio de Hcy sobre la migración de HUVEC. Porcentaje de área repoblada por HUVEC en función de M199-5X (control), colina 10-5 M en M199-5x (control positivo) y concentraciones crecientes de Hcy en M199-5X (n=3). . **p<0,001, n=3 respecto al control positivo.

Hcy (10 µM) no inhibió la migración de HUVEC inducida por colina, siendo ésta similar al control positivo (Fig. 4). No obstante, Hcy (50 y 100 µM) si disminuyo el porcentaje repoblado en comparación al control positivo. La Fig. 5 muestra que el porcentaje de área repoblada por HUVECs inducida por colina, disminuye gradualmente a medida que aumenta la concentración de Hcy, siendo estadísticamente significativa con Hcy 50 µM (10,9 ± 1,4%) y 100 µM (6,6 ± 0,3%), respecto al control positivo (25,7 ± 2,7%, $p<0,001$, para ambas). Hcy (10 µM) tiene un porcentaje de área repoblada por HUVECs inducida por colina (23,5 ± 2,4%), similar a aquella observada en el control positivo (25,7 ± 2,7%). Hcy (0 µM y sin colina, grupo control) presentó 3,1 ± 1,1% del área repoblada por HUVEC inducida por colina, efecto similar a Hcy (50, 100 µM), indicando que Hcy inhibe la migración de las células endoteliales a esas concentraciones.

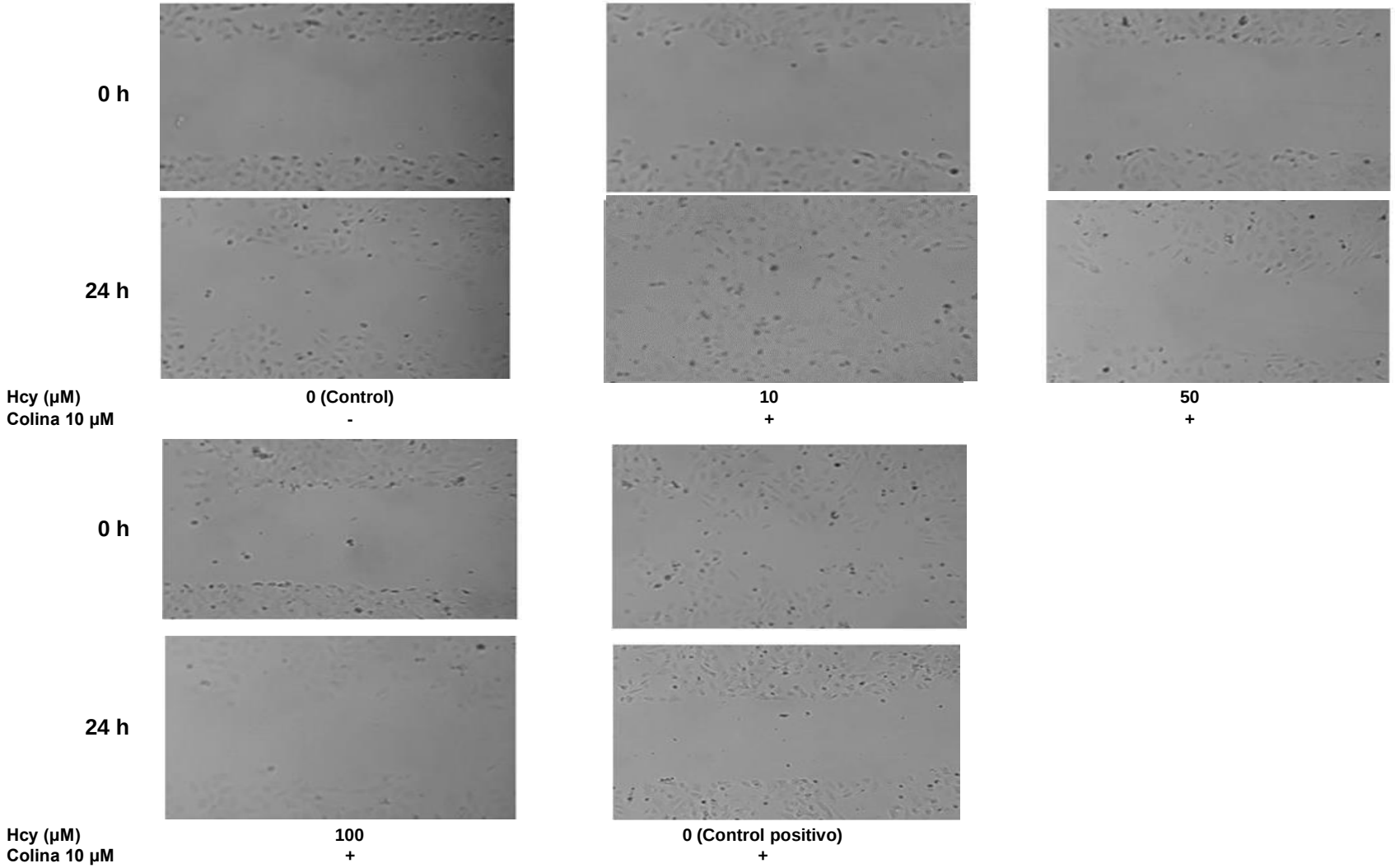

Figura 4. Efecto de Hcy sobre la migración de HUVEC inducido por la estimulación de α7-nAChR. Imágenes representativas de ensayo de migración a las 0 y 24 h. M199-5X (control), colina 10-5 M en M199-5X (control positivo) y concentraciones crecientes de Hcy junto a colina 10-5 M en M199-5X.

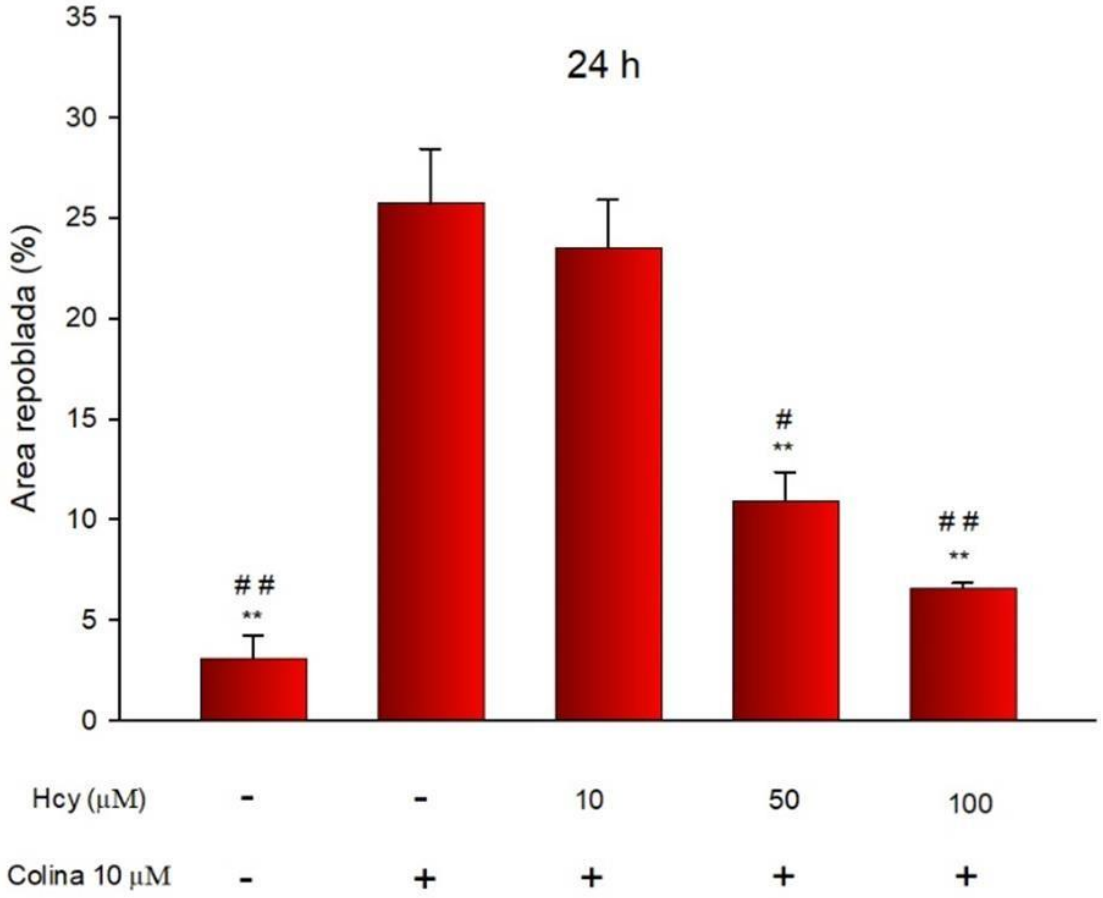

Figura 5. Efecto de Hcy sobre la migración de HUVEC inducido por la estimulación de α7-nAChR. Porcentaje de área repoblada por HUVEC en función de M199-5X (control), colina 10-5 M en M199-5X (control positivo) y concentraciones crecientes de Hcy junto a colina 10-5 M en M199-5X (n=3). **p<0,001, respecto al control positivo. #p < 0,05 y ##p< 0,001 respecto a Hcy 10 uM + colina.

DISCUSIÓN

La presente tesis evidenció, que a medida que aumenta la concentración de Hcy sobre 100 µM, disminuye gradualmente la densidad celular. La migración celular no es alterada por concentraciones intermedias de Hcy. Sin embargo, la migración celular inducida por colina, activador del receptor α7-nAChR, se inhibe gradualmente a medida que aumenta la concentración de Hcy.

Como fue señalado en resultados, se decidió descartar del estudio, el grupo incubado con 500 µM Hcy, debido a la importante disminución de la densidad celular. Sin embargo, Zhang y cols. (2017) reportaron que al incubar las HUVECs con esa misma concentración, no observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular respecto control, y que ésta disminuye en forma significativa a concentraciones igual o mayor a 1.000 µM. Al revisar los diseños experimentales, Zhang y cols. describen que el tiempo de incubación de HUVEC con 500 µM Hcy, es 12 h, y en nuestro estudio 48 h; el medio de cultivo utilizado es DMEM suplementado con SFB 10%, y en nuestro estudio M199 suplementado con SFB 5%, al estar menos enriquecido el medio de cultivo con SFB podría desfavorecer la viabilidad celular ante los efectos de 500 µM de Hcy. A pesar de las diferencias encontradas con el grupo de Zhang, ellos describen que concentraciones por sobre 1000 µM de Hcy genera estrés oxidativo, lo cual generaría estrés mitocondrial, aumento en el mal plegamiento de proteínas, este último a su vez generaría estrés del retículo endoplasmático, todas ellas, en conjunto inducirían a un estado pro-apoptotico. Sumado a lo anterior se ha

observado que al incubar HUVECs con 40 y 70 µM Hcy disminuiría la proliferación de las mismas (Pan y cols., 2017).

Se observó que la concentración de Hcy (10 µM) en el rango normal de circulación (10 a 15 µM) (Genoud y Quintana, 2016), no tiene efecto sobre la migración de las HUVECs inducida por colina. Pan y colaboradores, (2017), evaluaron el efecto de Hcy sobre la migración de HUVECs inducida por VEGF mediante el ensayo de lesión en monocapa. En dicho experimento, al evaluar el efecto de 10 µM de Hcy no se observaron diferencias significativas respecto a su control positivo, similar a lo observado en la presente tesis, demostrando que 10 µM de Hcy no tendría efectos sobre la migración celular de las HUVEC inducida por colina.

Al evaluar el efecto de la incubación con 50 y 100 µM Hcy sobre la migración de las HUVECs inducida por la activación del α7-nAChR, se observa una disminución del área repoblada estadísticamente significativa al comparar con el control positivo y no se observan diferencias significativas con la migración del control. Se ha reportado que al evaluar la migración celular mediante el ensayo de lesión en monocapa en HUVEC incubadas con 40 y 70 µM Hcy durante 24 h, se redujo significativamente en un 25% y 50% respectivamente la migración inducida por VEGF al comparar con el control positivo (Pan y cols., 2017). El segundo estudio, que asocia HHcy con angiogénesis, al incubar HUVECs con 50 µM Hcy y 50 µM adenosina durante 24 h y posterior estimulación de la migración celular con VEGF, se observa una disminución significativa en la distancia de migración recta

en comparación con el control, demostrando que concentraciones moderadas de Hcy (31-100 µM) reducen significativamente la migración en HUVEC inducida por la activación del α7-nAChR, mediante la disminución de la expresión de las quinasas reguladas extracelularmente 1 y 2 (ERK 1-2) y proteína quinasa b (también conocida como ATK) (Zhang y cols., 2012).

Los mecanismos mediante los cuales Hcy es capaz de reducir la migración y angiogénesis no se encuentran completamente dilucidados, además, a la fecha no existe información descrita sobre las posibles alteraciones generada por Hcy en la señalización inducida por la activación del α7-nAChR. No obstante, existen antecedentes que podrían otorgar una aproximación a los mecanismos mediante los cuales Hcy podría reducir la migración de las HUVECs inducida por la α7-nAChR.

Se ha reportado que la incubación de 40 y 70 µM Hcy en HUVEC durante 24 h reduce en forma estadísticamente significativa la expresión de los receptores de VEGF 1 y 2 e inhibe la formación de fibras de estrés de actina (Pan y cols. 2017), las cuales juegan un rol crucial en procesos como adhesión celular, morfogénesis y migración (Tojkander y cols., 2012). Sumado a lo anterior Zhang y colaboradores, (2012), reportaron que al co-incubar las HUVECs con 50 µM Hcy y 50 µM adenina durante 24 h, se observa una disminución de la expresión de las proteínas ERK 1-2 y AKT, moléculas importantes en el proceso de señalización intracelular desencadenado por la activación del α7-nAChR. Estableciendo antecedentes del efecto de Hcy en concentraciones moderadas (40 a 70 µM) actúa alterando las vías de señalización y transducción de señal (Figura 5).

La mirada de la mayoría de los autores sobre los efectos deletéreos de altas concentraciones de Hcy sobre las células endoteliales se basan en la generación de estrés oxidativo (Mujumdar y cols., 2001; Weiss, 2005; Tyagi y cols., 2005), no obstante, los antecedentes planteados anteriormente dan cuenta que no solo actúan alterando el estado REDOX de las células, ya que también son capaces de alterar la señalización intracelular de las mismas según los antecedentes ya expuestos (Pan y cols., 2017; Zhang y cols., 2012). Los mecanismos subyacentes sobre los efectos de Hcy y como se relaciona con la angiogénesis inducida por la activación del a7 aun necesitan ser investigados. Entender el mecanismo antiangiogenico de Hcy sobre los efectos pro angiogénicos de la señalización colinérgica permitiría plantear su posible utilidad como una diana farmacología.

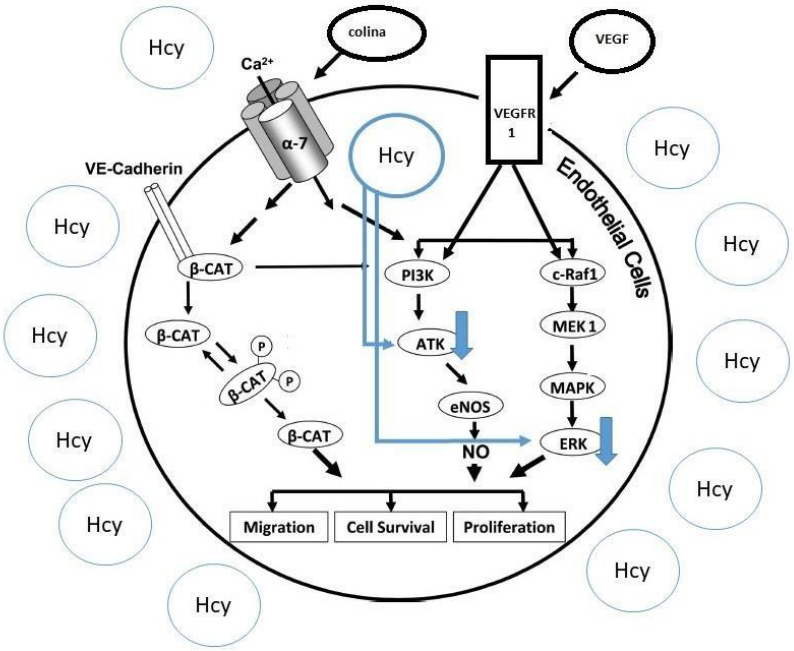

Figura 5. Efecto de Hcy sobre la transducción de señal de VEGF. Hcy disminuye la expresión de ERK1/2 y AKT, protenias implicadas en la transducción de señal de VEGF y del α7-nAChR, cumpliendo un rol critico en la inducción de angiogénesis en esta última.

CONCLUSIÓN

En resumen, el presente estudio sugiere que concentraciones intermedias de Hcy son capaces de inhibir en forma significativa la migración de las HUVECs inducido por la activación selectiva del α7.

REFERENCIAS

- Arias H, Richards V, Ng D, Ghafoori M, Le V y Mousa S. (2009). Role of non-neuronal nicotinic acetylcholie receptors in angiogénesis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41 (7), 1441–1451.
- Chrysant S, Chrysant G. (2018). The current status of homocysteine as a risk factor for cardiovascular diseases: A mini review. Expert Rev Cardiovac Ther. 16(8)559-565.
- Genoud V, Quintana I. (2016). N-Homocysteinylation reactions related to hyperhomocysteinemia. Acta Bioquim Clin Latinoam. 50(4); 679-85.
- Heeschen C, Weis M, Aicher A, Stefanie Dimmeler, Cooke J. (2002). A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. J. Clin. Invest. 110 (4);527–536.
- Instituto Nacional de Estadistica, Chile. Compendio Estadistico 2018. Pág. 72.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. 52 (11),2745-56.
- Jin X, Wang R, Wang H, Long C y Wang H. (2015). Brain protection against ischemic stroke using choline as a new molecular bypass treatment. Acta Pharmacol Sin. 36: 1-10.
- Krupinski J., Abudawood M., Matou-Nasri S., Al-Baradie R., Bogdan E., Justicia C., Planas A., Liu D., Rovira N., Grau-Slevin M., Secades J. y Slevin M. (2012). Citicoline induces angiogénesis improving

survival of vascular/human brain microvessel endothelial cells through pathways involving ERK1/2 and insulin receptor substrate-1. Vascular Cell. 4(1):20.

- Kundu, S., Kumar, M., Sen, U., Mishra, P.K., Tyagi, N., Metreveli, N. et al. (2009). Nitrotyrosinylation, remodeling and endothelial-myocyte uncoupling in iNOS, cystathionine beta synthase (CBS) knockouts and iNOS/CBS double knockout mice. J. Cell Biochem. 106(1);119–126.
- Li X y Wang H. (2005). Non-neuronal nicotinic Alpha 7 receptor, a new endotelial target for revascularization. Life Sciences. 78(16);1863 – 1870
- Liang C., Park A.y Guan J. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc. 2(2);329-333.
- Mujumdar V, Aru G, Tgagi S. (2001). Induction of oxidative stressby homocysteine impairs endothelial function. J Cell Biochem, 82 (3);491 – 500.
- Pan L, Yu G, Huang J, Zheng X, Xu Y. (2017). Homocysteine inhibits angiogenesis through cytoskeleton remodeling. Biosci Rep.37(5); 1-10.
- Schneider C., Rasband W. y Eliceiri K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Meth. 9(7);671-675.
- Tojkander S., Gateva G, Lappalainen P. (2012). Actin stress fibers—assembly dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 125, 1855-1864.

- Tyagi, N., Sedoris, K.C., Steed, M., Ovechkin, A.V., Moshal, K.S. and Tyagi, S.C. (2005). Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 289, H2649–H2656
- Weiss, N. (2005) Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocys-teinemia and its impact on endothelial function. Curr. Drug. Metab.6(1);27–36.
- Wu J, Chruscinski, Perez V, Singh H, Pitsiouni M, Rabinovitch M, Utz P, Cooke J. (2009). Cholinergic modulation of angiogenesis: Role of endothelial a7 nicotine acetylcholine receptor. Cell Biochem. 108(2): 433–446.
- Zhang Q, Li Q, Chen Y, Huang X, Yang I.H, Cao L, y cols. (2012). Homocysteine-impaired angiogenesis is associated with VEGF/VEGFR inhibition. Front. Biosci.1(4);2525-2535.
- Zhang Z, Wei C, Zhou Y, Yan T, Wang Z, Zhao L. (2017). Homocysteine induces apoptosis of humam umbilical vein endothelial cells via mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. Oxid. Med. Cell. Longev. 5736506(10):28

ANEXO

ANEXO 1

Universidad de Valparaíso
CHILE

CBI – Facultad de Farmacia

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA N°007/2018

PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRA AL SER HUMANO COMO SUJETO DE INVESTIGACION, EL USO DE MUESTRAS HUMANAS O DATOS PERSONALES.

El Comité de Bioética para la Investigación (CBI) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, constituido por Sergio Blaimont, Asesor Jurídico externo y los académicos de la Facultad de Farmacia, Prof. Rafael Jiménez (Presidente del CBI), Prof. Marcela Escobar (Secretaria del CBI), Prof. María Carolina Henríquez (Miembro del CBI) y Prof. Raúl Vinet (Miembro del CBI) declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto "Efecto de homocisteína sobre angiogénesis in vitro asociado a la activación de α7-nAChR en células endoteliales de vena umbilical humano" (Versión 16.04.2018), presentado por el investigador Sailor Foster Varas, alumno de pregrado de la Facultad de Farmacia.

Para su evaluación, el CBI revisó los antecedentes enviados por el investigador y que incluyen: (1) Solicitud para la aprobación de investigación que involucra al ser humano como sujeto de investigación, el uso de muestras humanas o el uso de datos personales (versión 09-2016), (2) Convenio de confidencialidad, (3) Consentimiento Informado y (4) Protocolo de recolección de cordones umbilicales para la obtención de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

Objetivo del Estudio. La investigación propone evaluar el efecto de Homocisteína sobre la angiogénesis inducida por la estimulación colinérgica en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano.

Metodología. Se trata de un estudio experimental, que comprende el aislamiento y cultivo primario de células endoteliales aisladas de cordón umbilical de mujeres embarazadas sanas, que donaron voluntariamente este material para los fines del estudio. Los cordones serán procesados de acuerdo a la metodología descrita por Jaffe y cols.(1973), obteniéndose un pool de células Estas células se someterán al ensayo de lesión de monocapa celular y WesternBlot de acuerdo con la metodología descrita por Mahmood y Yang (2012).

Acta CBI 007/2018

I. El CBI considera que el objetivo general ha sido bien definido y que la metodología asociada a su logro se ha establecido adecuadamente.

II. En la valoración bioética del proyecto, el comité considera que los derechos de las embarazadas donadoras de los cordones umbilicales y el destino de estos, están contemplados y resguardados través del consentimiento informado.

III. Por lo anterior, el CBI de la Facultad de Farmacia APRUEBA el protocolo experimental, tal y cual se señala en el proyecto.

Firman el Acta los miembros del Comité:

Rafael Jiménez

Marcela Escobar

Ma. Carolina Henríquez

Sergio Blaimont

Raúl Vinet

Valparaíso, 11 de mayo de 2018

Acta CBI 007/2018

ACTA ORIGINAL - CBI

SERVICIO DE SALUD
VALPARAISO-SAN ANTONIO
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

ANEXO 2

ACTA DE APROBACIÓN N°031/2018

El Comité Ético Científico del Servicio de Salud Valparaíso-San Antonio certifica haber evaluado en forma ejecutiva los antecedentes presentados del proyecto de investigación titulado: **"Efecto de homocisteína sobre angiogénesis in vitro, asociado a la activación de alpha 7-nAChR en células endoteliales de vena umbilical humana"**, y de acuerdo a lo estipulado en la normativa legal vigente para la investigación científica en seres humanos, lo aprueba por decisión unánime, en sesión del **22 de agosto 2018**, tomando en consideración los siguientes aspectos ético-científicos:

1) Valor social:
La investigación es relevante porque podría ser de utilidad para recoger información nueva y generar nuevas hipótesis en el tema.

2) Validez Científica:
El diseño se ajusta a las normas de investigación en seres humanos y es correcto según metodología de la investigación.

3) Razón riesgo/beneficio:
La proporción riesgo beneficio es favorable. El riesgo derivado del uso de datos personales y/o sensibles se minimizará tomando todos los resguardos necesarios.

4) Consentimiento Informado:
El proceso de consentimiento informado cuenta con los formularios que proveen toda la información requerida para que los participantes puedan tomar una decisión informada y se respeta el derecho como tal.

5) Respeto por los participantes:
Se respetará el derecho a la privacidad de los registros y el resguardo de la confidencialidad de los datos personales y sensibles, tomando todas las medidas existentes.

6) Idoneidad de la Investigadora Principal:
Los antecedentes curriculares señalan que la investigadora principal reúne las competencias necesarias para la conducción de este estudio. La investigadora se compromete a enviar un avance del estudio a los seis meses de iniciar su ejecución y remitir sus resultados al finalizarlo.

7) Evaluación ético científica independiente:
El Comité ético científico del SSVSA efectuó la evaluación ético científica previa aprobación del estudio y sus miembros presentes declararon no tener conflictos de intereses durante su evaluación.

INVESTIGADORA PRINCIPAL: QF. MAGDALENA CORTÉS SAAVEDRA
ALUMNO TESISTA: SAILOR FOSTER VARAS
SITIO DE INVESTIGACIÓN: HCVB, VALPARAÍSO
FECHA DE INGRESO A EVALUACIÓN: MAYO 2018
CEC EVALUADOR: COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO DEL SSVSA
FECHA DE APROBACIÓN: 22 DE AGOSTO DEL AÑO 2018

-1-

SERVICIO DE SALUD
VALPARAÍSO-SAN ANTONIO
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

DOCUMENTACIÓN APROBADA

El Comité Ético Científico del Servicio de Salud Valparaíso San Antonio, presidido por el Dr. Rodrigo Vergara Fisher, certifica haber recibido proyecto de investigación titulado: **"Efecto de homocisteína sobre angiogénesis in vitro, asociado a la activación de alpha 7-nAChR en células endoteliales de vena umbilical humana".**

INVESTIGADORA PRINCIPAL: QF. MAGDALENA CORTÉS SAAVEDRA
ALUMNO TESISTA: SAILOR FOSTER VARAS
SITIO DE INVESTIGACIÓN: HCVB, VALPARAÍSO
FECHA DE INGRESO A EVALUACIÓN: MAYO 2018
CEC EVALUADOR: COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO DEL SSVSA
FECHA DE APROBACIÓN: 22 DE AGOSTO DEL AÑO 2018

DOCUMENTACIÓN APROBADA:

Protocolo de estudio "Efecto de homocisteína sobre angiogénesis in vitro, asociado a la activación de alpha 7-nAChR en células endoteliales de vena umbilical humana", versión agosto 2018
Formulario de consentimiento informado para el participante en el estudio "Efecto de homocisteína sobre angiogénesis in vitro, asociado a la activación de alpha 7-nAChR en células endoteliales de vena umbilical humana", versión agosto 2018

Saluda atentamente a Usted,

DR. RODRIGO VERGARA FISHER
PRESIDENTE COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
SERVICIO DE SALUD VALPARAÍSO-SAN ANTONIO

-3-

SERVICIO DE SALUD
VALPARAÍSO-SAN ANTONIO
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

Aprobación del proyecto de investigación titulado: **"Efecto de homocisteína sobre angiogénesis in vitro, asociado a la activación de alpha 7-nAChR en células endoteliales de vena umbilical humana".**

INVESTIGADORA PRINCIPAL: QF. MAGDALENA CORTÉS SAAVEDRA
ALUMNO TESISTA: SAILOR FOSTER VARAS
SITIO DE INVESTIGACIÓN: HCVB, VALPARAÍSO
FECHA DE INGRESO A EVALUACIÓN: MAYO 2018
CEC EVALUADOR: COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO DEL SSVSA
FECHA DE APROBACIÓN: 22 DE AGOSTO DEL AÑO 2018

Consta que los miembros del Comité efectuaron la declaración de conflictos de intereses previa evaluación, en la cual ningún miembro declara tenerlos. Se aprueba estudio por unanimidad de los miembros presentes, el **22 de agosto del 2018**.

Miembros del CEC	APRUEBA	RECHAZA	SE ABSTIENE
Felipe Campos Araya			
Claudia Cartagena Salinas			
Marta Colombo Campbell			
Mariana Cubillos Gómez			
Fernando Moreno Astorga			
Santiago Parry Ramírez			
Giulian Giachetti Herrera			
Evelyn Quezada Collado			
Mariana Torres Brito			
Mario Villagra Jamett			
Rodrigo Vergara Fisher			

Le saluda atentamente,

DR. RODRIGO VERGARA FISHER
PRESIDENTE COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
SERVICIO DE SALUD VALPARAÍSO-SAN ANTONIO

-2-

SERVICIO DE SALUD VALPARAISO SAN ANTONIO
Comité de Ética Científico
22 AGO 2018

ANEXO 3

I

Formulario de Consentimiento Informado

El propósito del presente documento es invitarlo a participar en el estudio de investigación **"EFECTO DE HOMOCISTEINA SOBRE ANGIOGENESIS IN VITRO ASOCIADO A LA ACTIVACIONDE α7- nAChR EN CELULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL HUMANO"**

Usted ha sido invitado porque tiene un embarazo sano y se encuentra en trabajo de parto. El investigador principal es Bioquímico Magdalena Cortés , académico y el Sr. Sailor Foster Varas, estudiante de la carrera de Química y Farmacia, de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaiso y el estudio es patrocinado por el convenio de desempeño UVA 1401 de la Universidad de Valparaiso.

Su participación es **voluntaria** y para que usted pueda tomar una decisión informada, le explicaremos a continuación cuáles serán los procedimientos involucrados en la ejecución de la investigación, así como en qué consistirá su participación:

Dónde y cuándo se llevará a cabo la investigación

La investigación mencionada se realizará en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, durante el periodo de Agosto a Diciembre del año 2018.

Motivación y propósito del estudio

Homocisteina es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Es por ello, que investigaremos el efecto de éste sobre células aisladas de vasos sanguíneos del cordón umbilical donado.

En qué consiste su participación

Su participación en este estudio es completamente voluntaria, la cual consiste en la donación del cordón umbilical de su hijo posterior al parto.

Riesgos

La recolección del cordón umbilical no conlleva riesgos para usted o su hijo. En Chile el cordón umbilical es un material biológico de desecho.

Beneficios

No tiene beneficios directo, usted estará haciendo una libre y generosa contribución a la investigación científica en el área cardiovascular

Costos y pagos

No le implicará un gasto económico, ni recibirá dinero; los investigadores tampoco recibirán dinero por realizar la investigación.

Derechos del participante

A manifestar dudas y a hacer preguntas en cualquier momento, a la matrona a cargo del procedimiento, y al investigador principal, Magdalena Cortés al número 32 250 8112 o la dirección de correo electrónico magdalena.cortes@uv.cl, o a sailor.foster@gmail.com ***A la participación voluntaria, a conocer alternativas y a retirar consentimiento:*** Usted puede retirarse del presente estudio hasta el momento previo del retiro del cordón umbilical de su hijo desde las dependencias del hospital, comunicándolo a la matrona a cargo de la recolección.

A la atención y a una derivación oportuno La donación del cordón, no producirá ningún evento adversos a usted, ni a su recién nacido. Además, es importante señalar que esta investigación, no tiene un fin diagnóstico

A recibir información relevante derivada de la investigación Nuestro estudio requiere mezclar al menos tres cordones umbilicales de embarazos sanos Si usted lo desea, al finalizar nuestro estudio le enviaremos los resultados obtenidos en el presente estudio.

Confidencialidad

Reserva de la identidad del participante Sus datos serán identificados por un código, ya sea letra o número

Privacidad de los datos personales y sensibles El presente estudio no registrará datos de su ficha médica o la de su hijo.

Difusión y entrega de los resultados

Los resultados de la investigación podrán ser divulgados en publicaciones de tipo científico y/o académico, siempre resguardando su identidad.

Evaluación Ético Científica

Esta investigación ha sido evaluada y aprobada el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Valparaíso San Antonio y en caso de tener alguna dudas acerca de sus derechos como participante, puede contactarse con su Secretaria Ejecutiva, Dra. Mariana Cubillos, al número de teléfono 32-257 65 81 o escribir al correo electrónico: comiteetica.ssvsa@redsalud.gov.cl.

Acta de Consentimiento Informado del Participante

Yo,....., RUT....., declaro que el investigador principal Bioquímico, Magdalena Cortés Saavedra y el alumno tesista Sailor Foster Varas me ha invitado a participar en el estudio "EFECTO DE HOMOCISTEINA SOBRE ANGIOGENESIS IN VITRO ASOCIADO A LA ACTIVACIONDEα7-nAChR EN CELULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL HUMANO", que llevarán a cabo en el laboratorio de Unidad de Cultivo, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso. He leído completamente la información proporcionada en este documento acerca del mismo y en qué consistirá mi participación. Me han informado y explicado claramente cuáles son los procedimientos del estudio que se basa en la donación del cordón umbilical que se obtendrá al finalizar el parto. Asimismo, he tenido la oportunidad de hacer preguntas y resolver todas mis dudas con el investigador(a). Entiendo que poseo el derecho de revocar mi consentimiento sin que esta decisión pueda ocasionar algún perjuicio.

De acuerdo a lo declarado por mí en este documento, firmo aceptando mi participación voluntaria en esta investigación. Recibiré una copia completa y firmada de este documento.

Firma Participante y Fecha: _____

Nombre y Firma Investigador Responsable

_____

Fecha:

_____

Nombre y Firma Director del Establecimiento o su Delegado

Fecha:

V02-22-08-2018

22 AGO 2018