

## Trabajos Originales

# Angiogénesis pulmonar mediada por adenosina vía CXCL1/CXCR2

Julio E. Valdivia-Silva <sup>1,2</sup>, Geraldine K. López-Molina <sup>1</sup>, Juan C. González-Altamirano <sup>3</sup>

### Resumen

*Introducción: La enfermedad pulmonar inflamatoria crónica tiene como característica común el proceso de angiogénesis patológica. Recientes trabajos han relacionado a la adenosina, una molécula de señalización, y quimioquinas como reguladores de este proceso, aunque la relación y asociación entre estos factores no ha sido muy investigada. Objetivo: Determinar el papel de la adenosina en la angiogénesis sostenida en procesos pulmonares inflamatorios crónicos. Diseño: Experimental. Lugar: Bioterio del Grupo de Investigación en Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú e Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Material biológico: Ratones deficientes en adenosina deaminasa (ADA) de la cepa C57BL/6J. Métodos y procedimientos: Se evaluó la relación entre los niveles de adenosina en pulmón y la angiogénesis traqueal utilizando patrones morfométricos, además de la expresión de la quimioquina CXCL1 y su receptor mediante ensayos de PCR y Elisa. Principales medidas de resultados: Niveles de adenosina en pulmón, angiogénesis traqueal y expresión a CXCL1 y su receptor. Resultados: Se demostró un significativo incremento de angiogénesis relacionado a dosis elevadas de adenosina y una regresión importante del proceso al administrar ADA de reemplazo. Se encontró también niveles de CXCL1 elevados de manera dependiente a la adenosina, en los ratones deficientes. La neutralización in vivo del receptor de CXCL1 (mCXCR2) mostró una marcada inhibición de la acción angiogénica. Conclusión: Nuestros hallazgos sugieren que la adenosina juega un rol importante en la inducción de angiogénesis pulmonar vía CXCL1/CXCR2, en la enfermedad pulmonar crónica.*

### Palabras clave

*Enfermedad pulmonar; inflamación; adenosina; neovascularización patológica.*

## Via CXCL1/CXCR2 adenosine-mediated pulmonary angiogenesis

### Abstract

*Introduction: Chronic lung disease's feature is pathological angiogenesis, a still little understood process in this and other diseases. Recently adenosine, a signaling molecule, and chemokines have been considered regulators of this*

*process. Though, relationship between these factors has not been investigated. Objective: To determine the role of adenosine in the induction of angiogenesis during pulmonary chronic inflammation. Design: Experimental. Setting: Bioterio, Immunology Research Group, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Peru, and Biomedical Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de México. Biologic material: C57BL/6J adenosine deaminase (ADA)-deficient mice. Methods and interventions: By morphometric analysis we determined relationship between adenosine levels in lung and tracheal angiogenesis, and expression to CXCL1 and its receptor by PCR and Elisa assays. Main outcome measures: Lung adenosine levels, tracheal angiogenesis, and expression to CXCL1 and its receptor. Results: We demonstrated a significant increase of angiogenesis related*

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Inmunología, Departamento de Inmunología y Microbiología - Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa, Perú.

<sup>2</sup> Laboratorio de Quimioquinas, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas - Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.

<sup>3</sup> Departamento de Cardiología, División de Cirugía Vascular y Torácico, Hospital Nacional del Sur CASE - EsSalud. Arequipa, Perú.

to high doses of adenosine and an important inhibition of the process when we administered replacement ADA. In the ADA-deficient mice CXCL1 levels rose depending on adenosine levels. CXCL1 receptor (CXCR2) *in vivo* neutralization showed dramatic inhibition of angiogenic activity. Conclusions: Adenosine may play an important role, via CXCL1/CXCR2, in the induction of pulmonary angiogenesis in pulmonary chronic disease.

**Key words:** Pulmonary disease; inflammation; adenosine; neovascularization, pathologic.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad pulmonar crónica agrupa diversas patologías en las cuales la respuesta inmune lleva a una inflamación crónica, con pérdida progresiva de la función pulmonar, además de remodelación tisular con angiogénesis (1). Este proceso es ampliamente observado en el asma (2,3), con un grado de relación directa para la obstrucción, hiperreactividad y persistencia de inflamación. De manera similar, en la fibrosis pulmonar idiopática (IPF) y en el síndrome de bronquiolitis obliterante (BOS) se ha observado un incremento significativo del potencial angiogénico, con alto grado de remodelación vascular (4-6). Las células endoteliales de lavados bronquioalveolares de pacientes con sarcoidosis pulmonar también mostraron incrementada la capacidad para inducir angiogénesis comparada con la de individuos no afectados (7). Pero, pese a la constante evidencia, las vías reguladoras de angiogénesis en la enfermedad pulmonar no son bien comprendidas.

Las quimioquinas CXC son una familia de proteínas con actividad quimioatrayente, que contienen en su estructura cuatro cisteínas conservadas en su secuencia de aminoácidos (8). La presencia de los aminoácidos ELR (Glu, Leu, Arg) en el lado amino-terminal les adiciona capacidad proangiogénica a la molécula (8). Esta familia de quimioquinas es importante en procesos fisiológicos y patológicos, como hemostasia, isquemia y cáncer (9); pero, de igual forma, es poco conocida la regulación de su expresión durante estos procesos. Por otro lado, la adenosina es una molécula con funciones proangiogénicas bien conocidas, tanto *in vitro* como *in vivo* (10), y que durante procesos de estrés celular y daño puede acumularse y regular procesos inflamatorios vía receptores constitutivos de adenosina. Es co-

nocido que en el asma, por ejemplo, los niveles de adenosina en lavados bronquiales se relacionan con severidad de la enfermedad (2,3). Estos resultados sugieren que la adenosina puede estar involucrada en la patogenia de enfermedades pulmonares crónicas, involucrando a la angiogénesis.

Para evaluar los efectos de niveles de adenosina *in vivo*, en este trabajo usamos ratones deficientes de la enzima adenosina deaminasa (ADA) (11), la cual normalmente cataliza a este nucleósido, para poder determinar el efecto que existe entre la acumulación de la adenosina y el proceso angiogénico. Ya es conocido que niveles altos de ADA en estos ratones se asocia a inflamación pulmonar crónica y remodelación de la vía aérea (12), pero poco se sabe acerca de la angiogénesis y los factores que median el proceso. Adicionalmente, buscamos determinar si la quimioquina CXCL1 y su receptor constitutivo CXCR2 mediaban o no el efecto de la adenosina sobre la neoformación vascular traqueal. Esta relación fue pensada debido a que la quimioquina análoga a CXCL1 en humanos (CXCL8) se encuentra elevada en procesos inflamatorios crónicos, como el asma (13), y es un importante mediador de angiogénesis.

## MÉTODOS

El genotipo de los ratones deficientes para ADA se encuentra descrito anteriormente por Blackburn y col. (11). Cuarenta ratones deficientes de adenosina (*ADA*<sup>-/-</sup>) y 40 controles (*ADA*<sup>+</sup>) pertenecieron a la cepa C57BL/6J, producida en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue mantenida en el Bioterio del Grupo de Investigación en Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, durante todo el proceso de experimentación. El cuidado de los animales fue de acuerdo a los protocolos internacionales, con estricto control de contaminación.

A los ratones deficientes *ADA*<sup>-/-</sup> y controles *ADA*<sup>+</sup> (n=5 para cada grupo), previamente anestesiados se les realizó 5 lavados pulmonares, con 250 microlitros de buffer salino fosfato (PBS), pH 7,2, para recuperar cerca de 1 mL de lava-

do. Para el conteo diferencial de las células, se tomó alícuotas equivalentes de lavado bronquial y se las concentró mediante citospín en láminas portaobjetos (1000 rpm por 5 min), marcadas con *Diff-Quick* (Baxter Dade Diagnostics AG) y observadas al microscopio. La técnica original para el lavado bronquioalveolar fue descrita por Kayes y colaboradores (14).

Para la inmunohistoquímica de los vasos sanguíneos, los ratones fueron sacrificados en cámaras de CO<sub>2</sub> cerradas. Se extrajo cuidadosamente la tráquea del animal junto con sus pulmones, removiendo el tejido adyacente. Las tráqueas fueron fijadas con solución de zinc (BD Pharmingen) por 24 horas y lavadas 3 veces en PBS 1X pH 7,2 (3 minutos por lavado). Se permeabilizó los tejidos con PBS 1X más Tritón X-100 al 0,1%, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Se procedió a incubar los tejidos en peróxido de hidrógeno al 1%, durante 20 minutos, a temperatura ambiente, para bloquear peroxidasa endógenas. Posteriormente, se marcó los vasos utilizando la técnica descrita por Thurston y col., mediante la cual se perfunde lentamente la vasculatura con lectina de *L. esculentum* biotinilada (Vector Laboratories, CTR Scientific) y se logra la reacción con la peroxidasa del complejo avidina-biotina /diaminobenzidina (ABC/DAB) (15). Las tráqueas para evaluación morfométrica fueron deshidratadas y montadas con *Permount* (Fisher Chemical) (16).

La medición morfométrica de los vasos fue hecha en todas las tráqueas montadas y marcadas. Las imágenes fueron tomadas usando el objetivo 40x de un microscopio Olympus equipada con una cámara digital *Roper Scientific*. La cuenta de vasos fue determinada por uso de software *Image-Pro imaging* (MediaCybernetics). El número de vasos transversales a un anillo de cartílago fue tomado como índice representativo del número total de vasos en esa tráquea (16). El índice fue determinado colocando una línea de tamaño conocido paralela al eje longitudinal del anillo cartilaginoso y se contó el número de vasos que intersecaban la línea. Al menos 15 anillos de múltiples ratones por grupo fueron examinados. Los datos fueron expresados como el número de vasos por unidad de longitud dada por la línea dibujada.

Con relación al PCR en tiempo real, el ARN total fue aislado del tejido pulmonar de los ratones deficientes de adenosina y los controles sometidos o no a las terapias enzimática de reemplazo y con el anticuerpo anti-mCXCR2 descritas más adelante (n=5 ratones para cada grupo, N=40 ratones). Se utilizó un kit comercial de *Trizol* (Invitrogen Corp.). El ARN fue tratado con ADNasa libre de ARNasa y convertido a cADN, según instrucciones del fabricante (Invitrogen Corp.). El cADN pulmonar purificado fue llevado a reacción de PCR en tiempo real. Los transcritos fueron cuantificados usando sondas *Taqman* en un *ABI Prism 7000* (Applied Biosystems) y analizados por su propio *software*. Los primers y sondas fueron diseñados utilizando el *software Primer Express v2,0*, de Applied Biosystems, y fueron las siguientes: para CXCL1 (5'-CTGCACCCAAACCGAAGTC-3', antisentido 5'-AGCTTCAGGGTCAAGGCAAG-3', sonda 5'-CACTCAAGAATGGTCGCGAGGC-3'). Para β-actina (5'-GCTCTGGC TCCTAG-CACCAT -3', antisentido 5'-CCACCGATC-CACACAGAGTAC -3', sonda ATCAAGAT-CATTGCTCCTCCTGAGCGC-3'). CXCR2 (5'-GACTGTTACCTA AACGGTG -3', antisentido 5'-CATACCAAGATGGAAGGGAGC -3').

Para el dosaje de proteínas, se obtuvo un lisado de todas las proteínas del tejido pulmonar de 40 ratones, divididos en los grupos descritos en el párrafo anterior, y se determinó su concentración utilizando el kit *Bio-Rad Protein Assay* y bajo instrucciones de la hoja técnica (*Bio-Rad Laboratories*).

Con relación a la prueba de Elisa para CXCL1, iguales cantidades de proteína fueron colocadas en un ensayo de Elisa tipo sándwich, específico para CXCL1 (*R&D Systems*). Los datos fueron expresados como cantidad de proteína CXCL1 sobre proteína total en miligramos. El contenido de CXCL1 en los lavados bronquioalveolares fue determinado por placas de Elisa. Se expresó los datos como total de la proteína CXCL1 recuperada en el lavado. Los pasos del procedimiento se encuentran en la hoja técnica del kit comercial para pruebas de Elisa.

Cinco ratones deficientes de adenosina (*ADA*<sup>-/-</sup>) y cinco controles (*ADA*<sup>+</sup>) recibieron 5 U de la enzima

ADA modificada con polietilén glicol (PEG-ADA), descrita previamente (17), por vía intraperitoneal, en el día 18 de vida posnatal y dos veces más a los 4 y 8 días de la primera inyección. Tres días después (al décimo del inicio de la terapia), los ratones fueron sacrificados, para evaluar los efectos en la angiogénesis traqueal.

El anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón anti-CXCR2 (mCXCR2) fue producido por nuestro laboratorio mediante la inmunización de una cabra con un péptido que contenía la secuencia Met-Gly-Glu-Phe-Lys-Val-Asp-Lys-Phe-Asn-Ile-Glu-Asp-Phe-Phe-Ser-Gly de CXCR2 sintetizada por el Laboratorio de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para evaluar títulos séricos del anticuerpo, se usó Elisa directo contra el anti-CXCR2 murino y se probó la presencia de la proteína en el suero con *Western blot* y ensayos de neutralización frente al receptor blanco (datos no mostrados). Esta forma de obtención del anti-CXCR2 ya ha sido usada anteriormente para bloquear *in vivo* el mCXCR2, y para aislamiento de neutrófilos mediante *sorting* (18-20). La administración intraperitoneal de este anticuerpo no alteró la cuenta total de neutrófilos en sangre periférica (21). Para el experimento, se administró 1 mL de antisuero anti-mCXCR2 o 1 mL de PBS con 10 mg de IgG, para control.

Para la cuantificación de adenosina, los pulmones rápidamente removidos fueron congelados en nitrógeno líquido. Los nucleósidos de adenina fueron extraídos del pulmón usando ácido perclórico al 0,4 N (PCA) y la adenosina fue cuantificada utilizando cromatografía de líquidos en fase reversa (HP *Agilent* HPLC-1050) (22). Los niveles de adenosina fueron normalizados a contenido de proteínas y expresados en nmol/mg de proteína.

## RESULTADOS

El incremento de la vascularidad es una característica de la enfermedad pulmonar crónica (1,4,6). Para determinar si el fenotipo pulmonar inducido por adenosina observado en ratones *ADA*<sup>-/-</sup> resulta también en angiogénesis, se realizó inmunohistoquímica

de los vasos sanguíneos traqueales (Figura 1). La vasculatura de la tráquea de los ratones a los 18 días posnatales fueron extraídas, fijadas y marcadas, para evaluar el proceso angiogénico. La vasculatura fue cuantificada de acuerdo a lo explicado en la metodología. Los ratones deficientes de ADA (*ADA*<sup>-/-</sup>) mostraron un número aumentado de vasos, además de un mayor infiltrado celular y engrosamiento de vasos, comparados a los ratones controles (*ADA*<sup>+</sup>) (Figura 1 A, B). Para determinar si el incremento en la vasculatura dependía de la adenosina, los ratones fueron tratados con la enzima PEG-ADA, en el periodo en que la angiogénesis se encontraba establecida. Se inició las inyecciones de la enzima en el día 18 posnatal y posteriormente fueron dadas cada 4 días en dos oportunidades. El análisis de la vasculatura traqueal postratamiento (evaluadas 72 horas después de la última inyección) reveló que el tratamiento con la enzima fue capaz de revertir la angiogénesis previamente establecida (Figuras 1 A, B). Específicamente, los ratones *ADA*<sup>-/-</sup> que recibieron PEG-ADA mostraron un número de vasos similares a los ratones *ADA*<sup>+</sup>, indicando que los niveles de adenosina directamente correlacionan con el grado de vascularidad (Figura 1 B). Para verificar que la vascularidad había decrecido con los niveles de adenosina, los niveles de nucleósidos de adenina fueron extraídos y cuantificados de los pulmones de los ratones tratados, como se describió en la metodología. Los resultados demostraron que el tratamiento con PEG-ADA se asoció con una reducción significativa de adenosina en los pulmones (Figura 1 C).

Para evaluar los probables factores asociados a la angiogénesis en los ratones deficientes de ADA, se examinó la expresión de la quimioquina proangiogénica CXCL1. Se realizó PCR en tiempo real para el ARN total de los pulmones de los ratones *ADA*<sup>+</sup> y *ADA*<sup>-/-</sup>, en el día 18 posnatal (Figura 2). Los extractos de ARN de los pulmones mostraron incremento del mensajero en ratones *ADA*<sup>-/-</sup>, con respecto a los controles *ADA*<sup>+</sup>. La terapia de reemplazo con PEG-ADA dio como resultado reversibilidad en los niveles del ARN de CXCL1 de los ratones tratados (Figura 2 A). El nivel total de la proteína para CXCL1 fue obtenido mediante un Elisa específico para CXCL1, que reveló un

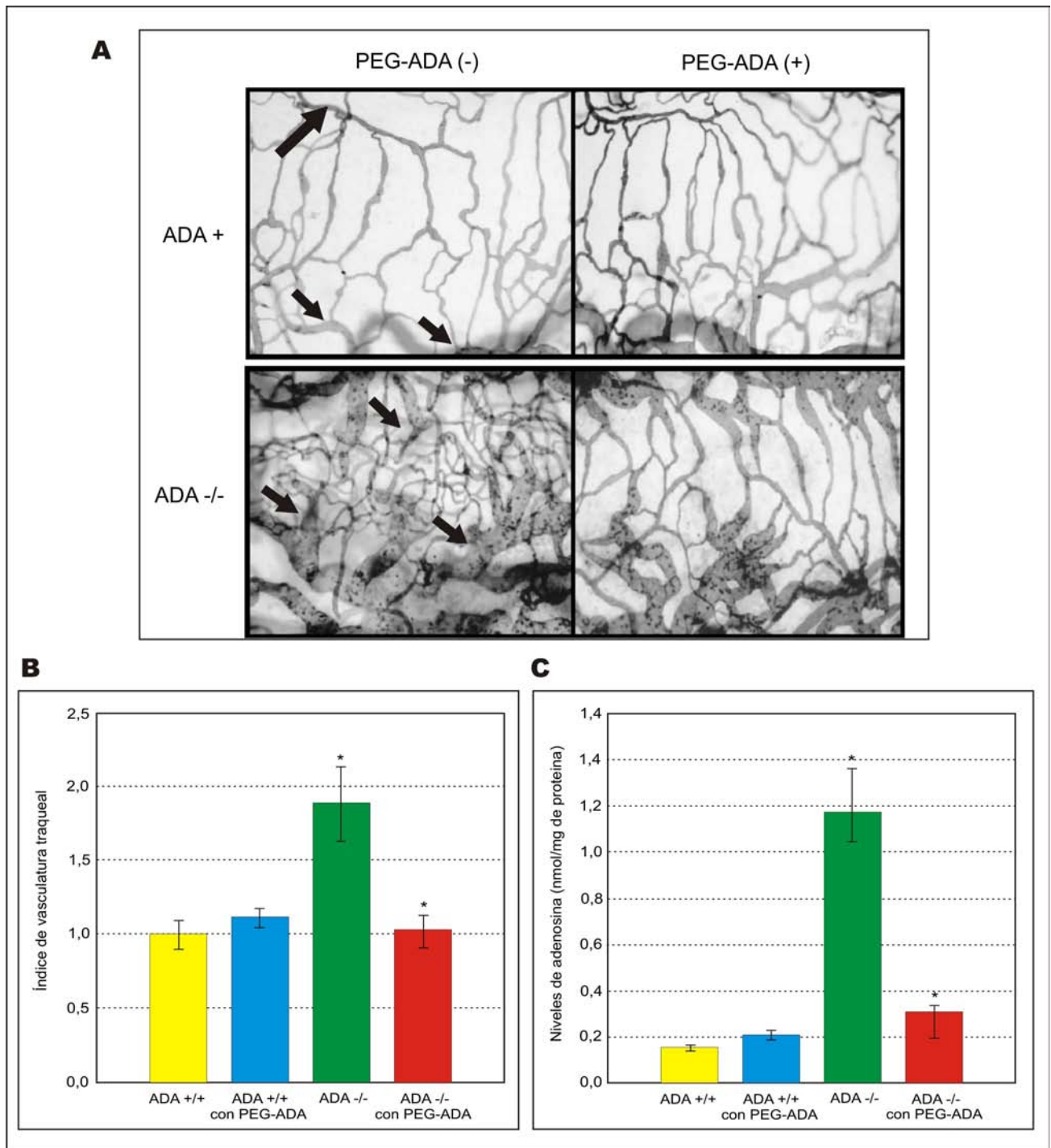


Figura 1. Efecto de la enzima PEG-ADA de reemplazo sobre la angiogenesis traqueal. A) Las tráqueas mostradas son de los ratones *ADA*<sup>+</sup> y *ADA*<sup>-/-</sup> sacrificados el día 18 posnatal y con terapia de reemplazo 10 días después. Las imágenes son representativas de 5 ratones por grupo. B) Índice de vascularidad traqueal que muestra las veces de incremento en el número de vasos. Se analizó 15 anillos traqueales por tráquea en los 5 ratones por grupo. C) Niveles de adenosina en los pulmones de los 5 ratones por grupo. Los datos se expresa en medias +/- desviación estándar. Se considera diferencia significativa una  $p \leq 0,05$ .

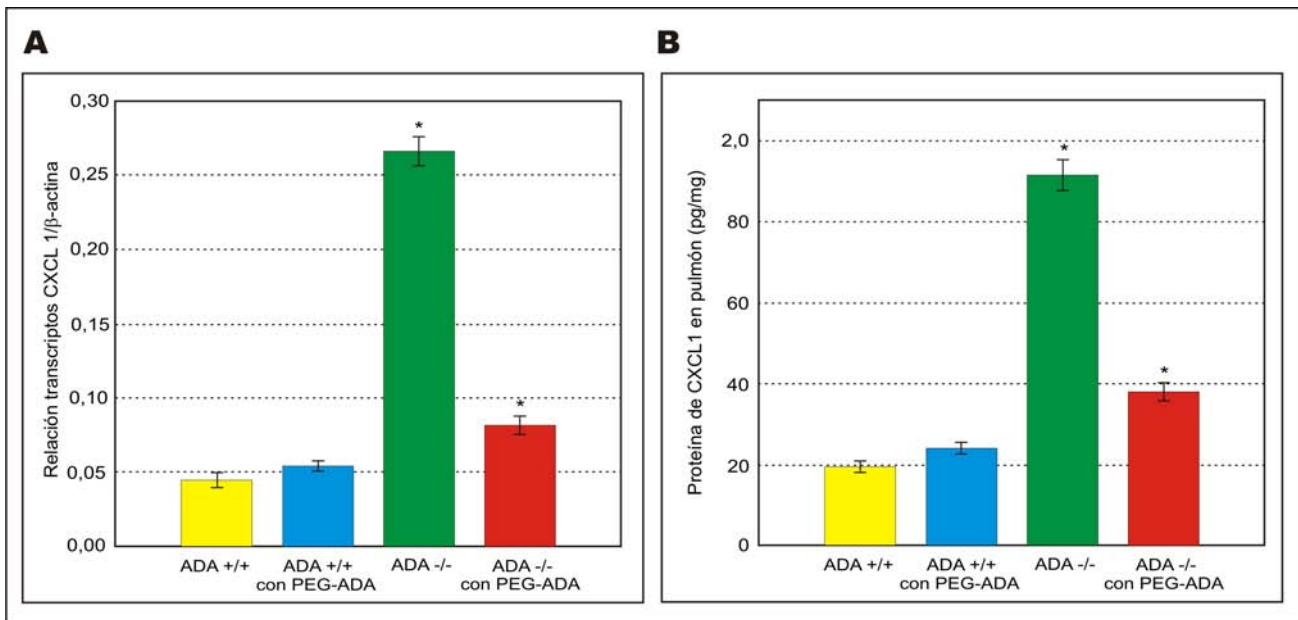


Figura 2. Niveles de ARN y proteína de CXCL1 en pulmones y lavado bronquioalveolar. A) RT-PCR en tiempo real para evaluar niveles de CXCL1 en ARN total de pulmones extraídos. Los transcritos de CXCL1 entre el valor de transcritos para  $\beta$ -actina representados mediante la media  $\pm$  la desviación estándar,  $n = 5$  para cada grupo. B) Cantidad de proteína de CXCL1 evaluado por ensayos específicos de Elisa. Los datos representan las medias  $\pm$  DE de la cantidad de proteína de CXCL1 en picogramos sobre el total de proteína pulmonar en miligramos,  $n = 5$  para cada grupo. Se considera una diferencia significativa con una  $p \leq 0,05$ .

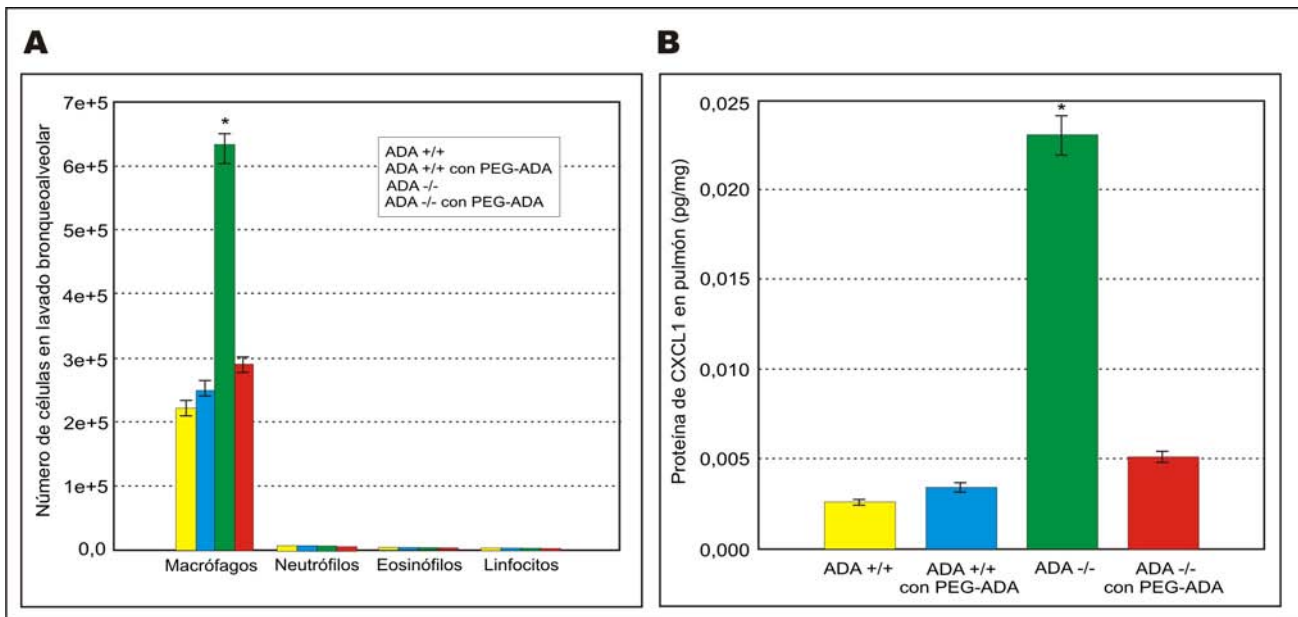


Figura 3. Macrófagos alveolares como fuentes de CXCL1 en ratones ADA $^{-/-}$ . A) Cuenta diferencial de células en lavados bronquioalveolares de ratones al día 18 posnatal. B) Niveles de transcritos de CXCL1/ $\beta$ -actina utilizando RT-PCR en tiempo real. Los datos representan la media  $\pm$  DE de un  $n = 5$  y con una diferencia significativa con valores de  $p \leq 0,05$ .

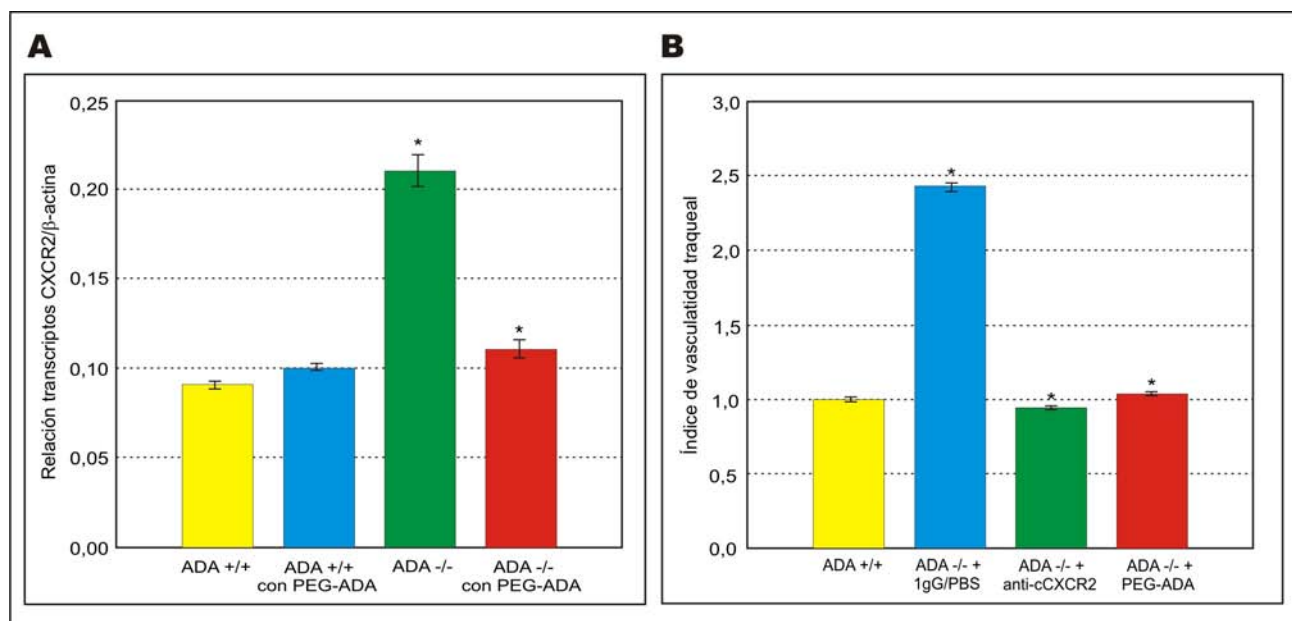


Figura 4. Influencia de CXCL1 y su receptor CXCR2 en la angiogénesis mediada por adenosina en ratones  $ADA^{-/-}$ . A) El ARN extraído del pulmón fue analizado utilizando RT-PCR en tiempo real, con un primer específico para CXCR2. Los datos representan la media de la relación entre los transcritos de CXCR2 / $\beta$ -actina +/- DE, n = 5 para cada grupo. B) Neutralización del receptor mCXCR2 in vivo utilizando un anticuerpo policlonal obtenido previamente de inmunización a una cabra. El control contenía PBS 1X, pH 7,2, con 10 mg de IgG. Los datos se representa con el índice de vascularidad traqueal +/- DE, n = 5 para cada grupo. Se considera diferencia significativa valores de  $p \leq 0,05$ .

incremento de la proteína en ratones  $ADA^{-/-}$ , el que fue reversible con el tratamiento enzimático de reemplazo (Figura 2 B). Adicionalmente, la proteína CXCL1 en los lavados bronquioalveolares de ratones  $ADA^{-/-}$  mostró el mismo comportamiento (no mostrado).

Con relación al CXCL1 en macrófagos alveolares de ratones  $ADA^{-/-}$ , los lavados alveolares de ratones  $ADA^{+}$  y  $ADA^{-/-}$  del día 18 posnatal fueron utilizados para hacer cuenta diferencial de células. El análisis reveló un número incrementado de macrófagos alveolares en la vía aérea de los ratones  $ADA^{-/-}$  frente a los controles (Figura 3 A). Para determinar si estas células eran la fuente de CXCL1, se realizó PCR en tiempo real para los *pellet* de los lavados bronquioalveolares. Los resultados mostraron que CXCL1 solo estaba presente en los *pellet* de los lavados de ratones  $ADA^{-/-}$ . También se observó disminución de los niveles del transcritos, al utilizar la enzima de reemplazo (Figura 3 B).

Para determinar el estatus de CXCR2 en los pulmones de ratones  $ADA^{-/-}$ , el ARN pulmonar fue analizado para CXCR2, utilizando PCR tiempo real. Se demuestra que el receptor CXCR2 está incrementado en los pulmones de los ratones deficientes, al día 18 posnatal. (Figura 4 A). De manera similar a lo encontrado anteriormente, los niveles del receptor también disminuyeron con el tratamiento de PEG-ADA, indicando un rol de la adenosina en la transcripción del receptor.

Para determinar la contribución de la señalización de CXCL1 vía CXCR2 en la angiogénesis pulmonar en ratones  $ADA^{-/-}$ , se les administró *por vía* intraperitoneal los anticuerpos anti-CXCR2 murino el día 18 posnatal (Figura 4 B). La inhibición del receptor CXCR2 resultó en la regresión de la actividad angiogénica a valores similares que la encontrada con el tratamiento de reemplazo enzimático. Estos resultados indican que la señalización a través del receptor CXCR2 es responsable de la actividad angiogénica incrementada en ratones  $ADA^{-/-}$ .

## DISCUSIÓN

La adenosina es una molécula de señalización que se acumula durante los procesos de inflamación y daño celular. Se ha encontrado niveles incrementados de esta molécula en los pacientes asmáticos (12), indicando un posible rol en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, la consecuencia funcional y su impacto en la inflamación pulmonar no es comprendida completamente. Los niveles elevados de adenosina en lavados bronquioalveolares, sangre y muestras de moco han sido encontrados en varias patologías pulmonares crónicas, como asma (4,5,23), fibrosis pulmonar (24), enfermedad obstructiva pulmonar crónica (6,12), y en suero de pacientes con enfermedades inflamatorias, como artritis reumatoide, sepsis y daño por isquemia-reperfusión (25-27). El proceso inflamatorio causa un incremento en la demanda energética con catabolismo de ATP y subsecuente elevación de adenosina, la cual se une a receptores de superficie celular acoplados a proteínas G ( $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_{2B}R$ , y  $A_3R$ ) para regular el proceso inflamatorio y restaurar el balance de oxígeno. Es clave para este balance la formación de nuevos vasos a partir de una red preexistente (angiogénesis). Este proceso, si bien es fisiológico, en procesos inflamatorios crónicos ha demostrado ser perjudicial en el progreso patológico, incluyendo la enfermedad pulmonar crónica. Aunque la evidencia de angiogénesis en la enfermedad pulmonar crónica está demostrada, los mecanismos moleculares por los cuales se inicia y progresa el proceso no están muy bien comprendidos. Un candidato capaz de inducir angiogénesis es la adenosina. Numerosos estudios ya han demostrado que la elevación crónica *in vivo* de adenosina lleva a procesos angiogénicos (10,28,29) y son coherentes en su rol para restaurar la homeostasis de oxígeno durante el daño. Las consecuencias de elevadas concentraciones de adenosina en la vasculatura pulmonar no han sido evaluadas anteriormente, de manera que nosotros, usando ratones deficientes en adenosina deaminasa (ADA), hemos pretendido evaluar dicha relación. El ratón *ADA*<sup>-/-</sup>, en asociación con niveles elevados de adenosina, desarrolla enfermedad pulmonar con características similares al asma, como inflamación crónica,

hiperreactividad de la vía aérea, hipersecreción de moco y fibrosis subepitelial (12,24). Thurston y col. utilizaron la cuantificación del número de vasos transversales a un anillo cartilaginoso como un índice representativo del número total de vasos traqueales (16). Nosotros utilizamos este índice para demostrar el incremento del número de vasos dependiente de adenosina. Aunque nuestros resultados no miden directamente la angiogénesis pulmonar, ésta se correlaciona a la traqueal (30). Estudios previos con adenosina buscaron relacionar su efecto angiogénico con la inducción del factor de crecimiento de endotelio-vascular (VEGF) (31). Pero, es también conocido que el desarrollo de nuevos vasos es un proceso multifactorial y que ha involucrado a muchas otras moléculas, como las quimioquinas (8). Las quimioquinas CXC son citoquinas quimioatrayentes involucradas en diversos procesos fisiológicos de tráfico celular, además de otros muchos patológicos. La presencia o ausencia en la secuencia del dominio (Glu-Leu-Arg) ELR confiere a estas moléculas la capacidad proangiogénica o antiangiogénica, respectivamente (8). Un claro ejemplo de su importancia es la inducción de angiogénesis en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, donde el VEGF no cumple un rol, a diferencia de la señalización por quimioquinas CXC (8). CXCL8/IL-8 es un miembro de las quimioquinas ELR, que ha sido implicada en el asma (32). Feoktistov y col. demostraron que el estímulo sobre el receptor de adenosina llevaba a liberación de CXCL8 en mastocitos humanos (13). CXCL1 es la quimioquina funcional homóloga a IL-8, la cual es perdida en el ratón por una delección ancestral (33). Nuestros resultados muestran niveles elevados de ARN - proteína de CXCL1 en los pulmones y lavados broncoalveolares de ratones *ADA*<sup>-/-</sup>; lo que significa que no solo es producida sino secretada a la vía aérea. La fuente de esta quimioquina parece ser el macrófago alveolar, que curiosamente se encuentra en mayor número en los ratones deficientes de ADA y se relaciona a los valores de CXCL1. La función del macrófago es muy importante en la historia natural de muchas enfermedades inflamatorias (34), de manera que nuestros resultados indican que en presencia de adenosina el macrófago alveolar es activado y representa, por tanto, un potencial blanco terapéutico en estas enfermedades. Sin em-



bargo, no se conoce los mecanismos de regulación de la adenosina en la expresión de CXCL1 por los macrófagos. Se ha visto que el receptor de baja afinidad  $A_{2B}R$  -activado solo en altas concentraciones de adenosina- se encuentra elevado en macrófagos activados <sup>(35)</sup>, es responsable para la expresión de CXCL8 en mastocitos humanos <sup>(13)</sup> y estimula la expresión de factores angiogénicos en células endoteliales. Además, los niveles del receptor  $A_{2B}R$  se encontraron elevados en pulmones de ratones  $ADA^{-/-}$  <sup>(36)</sup> con marcada disminución de la expresión de CXCL1, posterior a la neutralización del receptor <sup>(37)</sup>. Estos encuentros implican que el receptor  $A_{2B}R$  es regulador de la expresión de CXCL1 en pulmones de ratones  $ADA^{-/-}$ .

En este trabajo, nosotros mostramos que, en asociación a niveles elevados de adenosina y CXCL1, los ratones  $ADA^{-/-}$  desarrollan angiogénesis pulmonar. De manera interesante, los niveles del receptor CXCR2, el receptor constitutivo de CXCL1 <sup>(38)</sup>, también se encuentran elevados en estos ratones. El incremento del receptor CXCR2 puede ser debido a un incremento en la cantidad de células inflamatorias o a mayor receptor en las células residentes pulmonares, lo cual es aceptado debido a la hipoxia que ocurre durante los procesos de inflamación crónica <sup>(39)</sup>. Nuestros datos demuestran que la terapia de reemplazo con PEG-ADA puede reducir la expresión de CXCR2, sugiriendo que la hipoxia media este efecto, puesto que el número de células inflamatorias pulmonares no está alterado después del tratamiento <sup>(12)</sup>.

Para demostrar que la disminución de los niveles de adenosina *in vivo* cambiaría el estatus de CXCL1 y la angiogénesis, se inició terapia enzimática de reemplazo con PEG-ADA, iniciando el día en que ya se observaba un proceso bien establecido (18 días posnatales). Luego de 10 días de tratamiento (2 inyecciones dadas cada 4 días y analizadas 72 horas después de la última inyección), las medidas de los valores de CXCL1 demostraron una disminución significativa de ARN y proteína. De la misma manera, se observó completa regresión de la angiogénesis evidenciada por el número de vasos en tráquea. Por otro lado, la inhibición del receptor CXCR2 *in vivo* demostró de manera similar una regresión en la vasculatura traqueal, de manera

muy similar al tratamiento de reemplazo con PEG-ADA, lo que indica que la actividad angiogénica de adenosina en pulmones de ratones  $ADA^{-/-}$  es mediada por CXCL1, vía su receptor CXCR2. Aunque existe la posibilidad de la existencia de otros ligandos para este receptor, la asociación directa con adenosina sugiere fuertemente que es CXCL1 la molécula de interés. Experimentos *in vivo* que bloqueen CXCL1 podrán confirmar nuestros resultados en el futuro. Es importante indicar que durante la elaboración de este trabajo Mohsenin y col., comunicaron hallazgos similares a los encontrados por nosotros con respecto a la adenosina como inductor de angiogénesis en la enfermedad pulmonar crónica. Pero, a diferencia del modelo utilizado por ellos -que demuestran inhibición de angiogénesis en microensayos sobre córneas-, nosotros demostramos cambios en el modelo animal *in vivo* y no requerimos en momento alguno ensayos alternos para evaluar el proceso angiogénico <sup>(40)</sup>.

En resumen, nosotros demostramos que los ratones deficientes en ADA presentan angiogénesis pulmonar patológica asociada a los niveles altos de adenosina. Nuestros resultados muestran que los ratones  $ADA^{-/-}$  tienen valores elevados de ARN y proteína de la quimioquina proangiogénica CXCL1 y de su receptor CXCR2. De manera que, la alta actividad angiogénica en pulmones de estos ratones es directamente atribuible a la señalización de CXCL1 a través de CXCR2. De acuerdo a los hallazgos en este modelo *in vivo*, podríamos atrevernos a plantear la hipótesis que los niveles elevados de adenosina y quimioquinas CXC ELR+ encontradas en pacientes con enfermedad pulmonar inflamatoria crónica podrían ser las moléculas responsables para la angiogénesis sostenida en estas patologías, además de constituir un potencial blanco terapéutico en el futuro.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subvencionado económicamente por el Grupo de Investigación en Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, partida IRG2006-BV001B, y por el Laboratorio de Quimiocinas del Instituto de Investigaciones Biomédicas,

Universidad Nacional Autónoma de México, apoyo JVS-OBV12006. Agradecemos al Dr. Eduardo García Zepeda por su apoyo incondicional en la revisión de este manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tanaka H, Yamada G, Saikai T, Hashimoto M, Tanaka S, Suzuki K, et al. Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:1495-9.
2. Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Thorax.* 2001;56:902-6.
3. Charan NB, Baile EM, Pare PD. Bronchial vascular congestion and angiogenesis. *Eur Respir J.* 1997;10:1173-80.
4. Burdick MD, Murray LA, Keane M, Xue YY, Zisman DA, Belperio J, et al. CXCL11 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:261-8.
5. Turner-Warwick M. Precapillary systemic-pulmonary anastomoses. *Thorax.* 1963;18:225-37.
6. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Gomperts B, Xue YY, Hong K, et al. Role of CXCR2/CXCR2 ligands in vascular remodeling during bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest.* 2005;115:1150-62.
7. Weber J, Meyer KC, Banda P, Calhoun WJ, Auerbach R. Studies of bronchoalveolar lavage cells and fluids in pulmonary sarcoidosis. II. Enhanced capacity of bronchoalveolar lavage fluids from patients with pulmonary sarcoidosis to induce cell movement in vitro. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:1450-4.
8. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison C L, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2000;68:1-8.
9. Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burdick M, et al. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol.* 1997;62:588-97.
10. Dusseau JW, Hutchins PM, Malbasa DS. Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane. *Circ Res.* 1986;59:163-70.
11. Blackburn MR, Datta SK, Kellems RE. Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. *J Biol Chem.* 1998;273:5093-100.
12. Blackburn MR, Volmer JB, Thrasher JL, Zhong H, Crosby JR, Lee JJ, et al. Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. *J Exp Med.* 2000;192:159-70.
13. Feoktistov I, Biaggioni I. Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest.* 1995;96:1979-86.
14. Kayes SG, Jones RE, Omholt PE. Use of bronchoalveolar lavage to compare local pulmonary immunity with the systemic immune response of *Toxocara canis*-infected mice. *Infect Immun.* 1987;55:2132-6.
15. Thurston G, Baluk P, Hirata A, McDonald DM. Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *Am J Physiol.* 1996;271:H2547-H2562.
16. Thurston G, Murphy TJ, Baluk P, Lindsey JR, McDonald DM. Angiogenesis in mice with chronic airway inflammation: strain-dependent differences. *Am J Pathol.* 1998;153:1099-112.
17. Young HW, Molina JG, Dimina D, Zhong H, Jacobson M, Chan L-NL, et al. A3 adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol.* 2004;173:1380-9.
18. Mehrad B, Strieter RM, Moore TA, Tsai WC, Lira SA, Standiford TJ. CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol.* 1999;163:6086.
19. Moore TA, Newstead MW, Strieter RM, Mehrad B, Beaman BL, Standiford TJ. Bacterial clearance and survival are dependent on CXC chemokine receptor-2 ligands in a murine model of pulmonary *Nocardia asteroides* infection. *J Immunol.* 2000;164:908.
20. Tsai WC, Strieter RM, Mehrad B, Newstead MW, Zeng X, Standiford TJ. CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun.* 2000;68:4289.
21. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, Phillips RJ, et al. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest.* 2002;110:1703.
22. Blackburn MR, Gao X, Airhart MJ, Skalko RG, Thompson LF, Knudsen TB. Adenosine levels in the postimplantation mouse uterus: quantitation by HPLC-fluorometric detection and spatiotemporal regulation by 5'-nucleotidase and adenosine deaminase. *Dev Dyn.* 1992;194:155-68.
23. Huszar E, Vass G, Vizi E, Csoma Z, Barat E, Molnar VG, et al. Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J.* 2002;20:1393-8.
24. Chunn JL, Mohsenin A, Young HW, Lee CG, Elias JA, Kellems RE, et al. Partially adenosine deaminase-deficient mice develop pulmonary fibrosis in association with adenosine elevations. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290:L579-L587.
25. Jabs CM, Sigurdsson GH, Neglen P. Plasma levels of high-energy compounds compared with severity of illness in critically ill patients in the intensive care unit. *Surgery.* 1998;124:65-72.
26. McEvoy AN, Murphy EA, Ponnio T, Conneely OM, Bresnihan B, FitzGerald O, et al. Activation of nuclear orphan receptor NURR1 transcription by NF- $\kappa$ B and cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding

- protein in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Immunol.* 2002;168:2979-87.
27. Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. The anti-inflammatory potential of adenosine in ischemia-reperfusion injury: established and putative beneficial actions of a retaliatory metabolite. *Shock.* 1997;8:313-20.
  28. Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, et al. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res.* 2002;90:531-8.
  29. Montesinos MC, Shaw JP, Yee H, Shamamian P, Cronstein BN. Adenosine A(2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am J Pathol.* 2004;164:1887-92.
  30. Lee CG, Link H, Baluk P, Homer RJ, Chapoval S, Bhandari V, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med.* 2004;10:1095-103.
  31. Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:601-15.
  32. Nocker RE, Schoonbrood DF, van de Graaf EA, Hack CE, Lutter R, Jansen HM, et al. Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996;109:183-91.
  33. Modi WS, Yoshimura T. Isolation of novel GRO genes and a phylogenetic analysis of the CXC chemokine subfamily in mammals. *Mol Biol Evol.* 1999;16:180-93.
  34. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med.* 2005;33:S506-S509.
  35. Blackburn MR, Chun GL, Young HWJ, Chunn JL, Banerjee SK, Elias JA. Adenosine mediates IL-13-induced inflammation and remodeling in the lung: evidence for an IL-13-adenosine amplification pathway. *J Clin Invest.* 2003;112:332-44.
  36. Chunn JL, Young HW, Banerjee SK, Colasurdo GN, Blackburn MR. Adenosine-dependent airway inflammation and hyperresponsiveness in partially adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol.* 2001;167:4676-85.
  37. Sun CX, Zhong H, Mohsenin A, Morschl E, Chunn JL, et al. Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J Clin Invest.* 2006;116:2173-82.
  38. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol.* 2000;165:5269-77.
  39. Moldobaeva A, Wagner EM. Difference in proangiogenic potential of systemic and pulmonary endothelium: role of CXCR2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288:L1117-L1123.
  40. Mohsenin A, Burdick MD, Molina JG, Keane MP, Blackburn MR. Enhanced CXCL1 production and angiogenesis in adenosine-mediated lung disease. *FASEB J.* 2007;21:1026-36.

Manuscrito recibido el 11 de setiembre de 2007 y aceptado para publicación el 26 de setiembre de 2007.

*Correspondencia:*

Dr. Julio Ernesto Valdivia-Silva  
Laboratorio de Quimiocinas, Departamento de Inmunología,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas sede Circuito Escolar,  
Ciudad Universitaria s/n, Universidad Nacional Autónoma  
de México, CP 04510, México D. F.  
Correo-e: jvsilva@nucleares.unam.mx