



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



## PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología

**“Efecto de los péptidos antimicrobianos PaDef y  $\gamma$ -tionina sobre células endoteliales EA.hy926 y BUVEC: implicaciones en la estimulación del VEGF en procesos angiogénicos”**

Tesis

Para obtener el grado de  
**Doctora en Ciencias Biológicas**  
Opción: Biotecnología Molecular

Presenta

**M.C. Elba Andrea Falcón Ruiz**

Directora

**Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa**

Co-director:

**Dr. Joel Edmundo López Meza**

Sinodales:

**Dra. Martha Eva Viveros Sandoval**

**Dr. Gerardo Vázquez Marrufo**

**Dr. Bruno Rivas Santiago**

Morelia, Michoacán. Agosto, 2023.

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la dirección de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa y el Dr. Joel Edmundo López Meza.

Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (14.1) y CONACyT (CB-2016-287210).

Agradezco a CONACyT por la beca (743639) otorgada durante mis estudios de doctorado.



## Contenido

|  | Página |
|--|--------|
| Resumen .....  | 6      |
| Abstract .....   | 8      |
| I. Introducción .....  | 10     |
| I.1. Angiogénesis .....  | 10     |
| I.2. Mecanismos de la angiogénesis .....   | 11     |
| I.3 Endotelio vascular .....   | 12     |
| I.4. VEGF .....  | 15     |
| I.5. Patologías asociadas a la angiogénesis .....  | 17     |
| I.6. Tratamientos para la angiogénesis .....   | 18     |
| I.7. Péptidos antimicrobianos .....  | 20     |
| I.8. Defensinas .....  | 21     |
| I.9. PaDef .....   | 23     |
| I.10. $\gamma$ -tionina .....  | 24     |
| II. Antecedentes .....   | 25     |
| III. Justificación .....   | 26     |
| IV. Hipótesis .....  | 27     |
| V. Objetivos .....   | 27     |
| 1. General .....   | 27     |
| 2. Específicos .....   | 27     |
| VI. Estrategia experimental .....  | 28     |
| VII. Resultados .....  | 29     |
| 1. Capítulo I. The plant defensins PaDef and $\gamma$ -thionin inhibit the endothelial cell response to VEGF. ....                                       | 30     |
| 2. Capítulo II. Las defensinas de plantas PaDef y $\gamma$ -tionina inhiben la activación endotelial inducida por VEGF en células humanas EA.hy926 ..... | 41     |
| Resumen .....  | 42     |
| Abstract .....   | 43     |
| Introduction .....   | 44     |
| Materials and methods .....  | 45     |
| Results .....  | 50     |

|   |     |
|---|-----|
| Discussion .....  | 60  |
| Conclusions .....   | 63  |
| References .....  | 63  |
| 3. Capítulo III. Un nuevo método para determinar la adhesión de células polimorfonucleares de sangre periférica (PMN) a células endoteliales mediante citometría de flujo ..... | 67  |
| Resumen .....   | 67  |
| Abstract .....  | 68  |
| Introduction.....   | 69  |
| Materials and Methods.....  | 70  |
| Protocol .....  | 71  |
| Data analysis .....   | 75  |
| Results and Discussion.....   | 76  |
| Conclusion.....   | 80  |
| Expected outcomes .....   | 80  |
| Limitations .....   | 80  |
| Troubleshooting .....   | 80  |
| References .....  | 81  |
| 4. Capítulo IV. “Vasos sanguíneos, las carreteras de mi cuerpo” .....   | 83  |
| VIII. Discusión general .....   | 91  |
| IX. Conclusión general .....  | 91  |
| X. Perspectivas y recomendaciones .....   | 102 |
| XI. Referencias .....   | 103 |

## Resumen

La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes y es regulada por factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y las interleucinas (IL)-6 y 8 o por condiciones de hipoxia, así como por factores anti-angiogénicos como el interferón (INF)- $\alpha$  y la endostatina. Este proceso se relaciona con la inflamación y algunos procesos fisiológicos como la reparación de heridas y el mantenimiento de tejidos; sin embargo, en algunas patologías se favorece el proceso angiogénico a través de la producción de moléculas inflamatorias, como en los tumores o en los tejidos que sufren daño mecánico. Por lo anterior, se han buscado tratamientos que regulen la angiogénesis, y en este sentido los péptidos antimicrobianos de plantas (PAPs) representan una alternativa. En el grupo de investigación se ha trabajado con los PAPs PaDef de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) y  $\gamma$ -tionina de chile habanero (*Capsicum chinense*), los cuales son citotóxicos sobre células cancerosas, además de ejercer funciones inmunomoduladoras. En este trabajo se evaluó el efecto de los PAPs  $\gamma$ -tionina y PaDef sobre funciones angiogénicas en células endoteliales humanas (EA.hy926) y bovinas (BUVEC) reguladas por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se evaluó la viabilidad y proliferación celular, además de procesos relacionados con la angiogénesis (migración, quimiotaxis, formación de estructuras tubulares), así como ensayos de docking molecular. Asimismo, se analizó mediante RT-qPCR la expresión de genes relacionados con la activación endotelial, se cuantificaron moléculas de activación endotelial por citometría de flujo y finalmente se determinaron procesos de interacción célula-célula mediante un nuevo protocolo propuesto en este trabajo. Los resultados mostraron que el VEGF (10 ng/mL) estimuló la proliferación de las células BUVEC y EA.hy926 (~20%); sin embargo, los péptidos por sí solos no afectaron la proliferación de ambos tipos celulares, pero ambos PAPs (5-500 ng/mL) revirtieron el efecto inducido por el VEGF. Además, el

VEGF favoreció la migración de las células BUVEC y EA.hy926, pero ambos PAPs (5 ng/mL) inhibieron el estímulo del VEGF. Por otro lado, se utilizó DMOG 50  $\mu$ M en las células BUVEC y EA.hy926 con la finalidad de simular químicamente la hipoxia. El DMOG revirtió la acción inhibitoria de ambos péptidos sobre el estímulo de VEGF en las células endoteliales con respecto a la proliferación. Además, se determinó que los PAPs no afectaron la formación de estructuras tubulares pero disminuyeron la cantidad de tubos formados en las células EA.hy926 estimuladas con VEGF. Los ensayos de acoplamiento mostraron una posible interacción entre ambos PAPs y el receptor VEGFR-2. Asimismo, en las células EA.hy926 se determinó la activación endotelial, ya que éstas respondieron mejor al estímulo angiogénico. La adherencia de las células EA.hy926 a matrigel se indujo por  $\gamma$ -tionina, pero no así por PaDef. La combinación VEGF-PaDef favoreció ligeramente la adherencia (5% aproximadamente), pero la mezcla VEGF- $\gamma$ -tionina no la modificó. Además, PaDef incrementó la expresión de E-selectina y VEGFA7. Con respecto a la regulación de elementos de la respuesta inflamatoria, el análisis de la secreción de citocinas de las células EA.hy926 mostró un aumento en la producción de IL-8 e IL-6 en los tratamientos con las mezclas de VEGF-péptido. Finalmente, se estableció un nuevo protocolo mediante citometría de flujo para evaluar la adhesión de las células polimorfonucleares (PMN) a las células endoteliales (capítulo 3). Los resultados mostraron que los tratamientos con los péptidos no modificaron la adhesión de las PMN. En conclusión, estos resultados sugieren que los PAPs son moduladores de la actividad del VEGF sobre el endotelio al interferir en procesos angiogénicos estimulados por este factor de crecimiento, como lo son la proliferación, migración y quimiotaxis. Además, los PAPs interfieren con la activación inducida por el VEGF en células endoteliales, probablemente mediante la interacción directa entre los péptidos y el VEGF, evitando así, la activación de la vía clásica del VEGFR2, además de la probable activación de una vía no asociada con el receptor VEGFR2.

**Palabras Clave:** Angiogénesis, péptidos, VEGF, endotelio, activación

## Abstract

Angiogenesis refers to the formation of blood vessels from pre-existing ones. It is regulated by pro-angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), and interleukins (IL)-6 and 8 or by hypoxia conditions, as well as anti-angiogenic factors such as interferon (INF) - $\alpha$  and endostatin. It is related to inflammatory processes and has an essential role in physiological processes such as wound repair and tissue maintenance; however, it has been seen that some pathologies favor the angiogenic process producing inflammatory molecules, as in cancerous tumors or tissues that have suffered mechanical damage. Therefore, we have sought treatments to regulate angiogenesis; however, the high costs and side effects remain inconvenient. Plant antimicrobial peptides (PAPs) represent an alternative as regulators of angiogenesis because some families of plant peptides have significant similarities with mammalian peptides, such as defensins. The research group has worked with PAPs PaDef avocado and  $\gamma$ -thionin habanero pepper, which exert a cytotoxic effect on cancer cells, and has proposed that they can stimulate immunomodulatory functions. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of the antimicrobial peptides  $\gamma$ -thionin from *C. chinense* and PaDef from *Persea americana* var. *drymifolia* on angiogenic functions stimulated by VEGF on human endothelial cells EA.hy926 and bovine endothelial cells BUVEC.

Cell viability and proliferation were evaluated, along with angiogenesis-related processes (migration, chemotaxis, tubular structures formation) and molecular docking trials. Likewise, endothelial activation gene expression was analyzed by RT-qPCR, endothelial activation molecules were quantified by flow cytometry, and cell-interaction processes were determined by a new protocol proposed in this work. The results showed that VEGF (10 ng/mL) stimulates cell proliferation of BUVEC and EA.hy926 (~20%), but peptides do not affect the proliferation of both cell types; however, PaDef or  $\gamma$ -thionin (5-500 ng/mL) reversed the VEGF- effect. In addition,

VEGF increased the migration of HUVEC and EA.hy926 cells, but both PAPs (5 ng/mL) inhibited the VEGF stimulation. DMOG 50  $\mu$ M was used to simulate the hypoxia condition in cells. DMOG reversed the inhibitory action of both peptides on VEGF stimulation in endothelial cells concerning proliferation. Additionally, PAPs do not affect the formation of tubular structures but decrease the number of tubes formed in EA.hy926 cells stimulated with VEGF. In addition, coupling trials showed a possible interaction between both PAPs and the VEGFR receptor -2 (VEGFR-2). Further, endothelial activation was evaluated in EA.hy926 cells since these responded better to the angiogenic stimulus. Adherence of endothelial cells to a rich-protein matrix showed that  $\gamma$ -thionin increased cell adhesion but not PaDef. The VEGF-PaDef mix showed a slight increase in adhesion (approximately 5%), but the VEGF-  $\gamma$ -thionin mix did not modify it. The gene expression analysis showed an up-regulation of E-selectin and VEGF7 genes by PaDef. On the other hand, cytokine secretion analysis showed a decrease in the production of IL-8 and IL-6 in VEGF-peptide treatments compared to VEGF. Also, endothelial cells' ability to maintain adhered peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was determined (protocol proposed in this paper, chapter 3). The results showed that peptide did not increase the adhesion of PBMCs on endothelial cells. In conclusion, the results suggest that PAPs could be modulators of VEGF activity on the endothelium, interfering with proliferation, migration, and chemotaxis induced by this factor. Also, the peptides affect the endothelial activation induced by the VEGF, probably by direct contact between peptides and VEGF avoiding VEGFR2 activation. Still, also the peptides could be activating an alternative VEGFR2 pathway.

# **I. Introducción**

En mamíferos existe una red vascular encargada de la distribución de nutrientes y oxígeno a través del organismo; esta red está formada por vasos sanguíneos como las venas y las arterias (Viallard & Larrivéé, 2017). Los vasos sanguíneos cumplen funciones asociadas a la respuesta inmune como el inicio de la inflamación en sitios específicos y además ayudan al mantenimiento de los tejidos a través de la formación de nuevos vasos sanguíneos (Patan, 2000). Estos procesos son posibles gracias a las células endoteliales, las cuales forman la capa más interna de los vasos sanguíneos y son las responsables de iniciar respuestas específicas mediante un proceso llamado activación endotelial, por lo que dependiendo del estímulo inductor que sensen las células endoteliales, se desencadena una respuesta orientada hacia la inflamación o a la angiogénesis (Chang, 2022).

## **I.1. Angiogénesis**

La formación de nuevos vasos sanguíneos es imprescindible para el desarrollo y mantenimiento de los mamíferos, ya que a través de estos se logra la distribución de los nutrientes y el oxígeno; asimismo, se lleva a cabo la remoción de los desechos generados por el metabolismo (Viallard & Larrivéé, 2017).

La red vascular se genera mediante dos procesos: 1) vasculogénesis y 2) angiogénesis. La vasculogénesis se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del mesodermo durante el desarrollo embrionario, mientras que la angiogénesis consiste en la formación de vasos sanguíneos a partir de otros vasos preexistentes (Streit & Detmar, 2003). La angiogénesis tiene un papel fundamental en la reparación de heridas y en el mantenimiento de los tejidos, y es un proceso que se caracteriza por la proliferación y migración de las células endoteliales para formar las estructuras vasculares (Patan, 2000).

La angiogénesis se regula por factores pro-angiogénicos que la estimulan y por factores anti-angiogénicos que la apagan o inhiben. Ambos grupos de factores

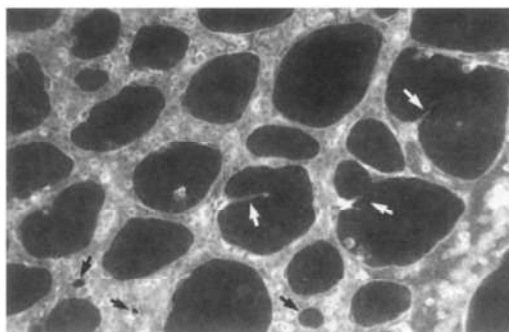
son requeridos para llevar a cabo un control fisiológico adecuado y de manera controlada, la pérdida de este equilibrio se puede asociar con diferentes patologías como el cáncer, metástasis, retinopatía, artritis, etc. (Medina Torres, 2017).

Los factores pro-angiogénicos inducen la generación de nuevos vasos sanguíneos promoviendo la proliferación de células endoteliales vasculares. Entre estos se encuentran el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la angiopietina-1 (ANG-1), los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) y las interleucinas IL-6 e IL-8, diversas metaloproteínas, entre otros (Viillard & Larrivé, 2017). Por otro lado, los factores anti-angiogénicos antagonizan la función de los pro-angiogénicos, siendo algunos el interferón- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ), los inhibidores de metaloproteínas, la IL-12, la angiostatina, la trombospondina-1 (TSP-1), o la endostatina (Jiménez-Andrade & González-Espinosa, 2011; Patan, 2000).

## **I.2. Mecanismos de la angiogénesis**

La angiogénesis puede llevarse a cabo mediante dos procesos, “sprouting” (brote angiogénico) y “non-sprouting” (angiogénesis sin brote), también conocida como “intussusception” (invaginación). Ambos procesos pueden ocurrir al mismo tiempo y no son excluyentes.

El brote angiogénico consiste en el crecimiento de un vaso sanguíneo a partir del estímulo sobre una célula endotelial, este se caracteriza por asemejar una ramificación en el vaso. Por otro lado, la angiogénesis por invaginación se genera a partir de la división de un vaso por influencia de las células muro (fibroblastos, pericitos) y de la presión y flujo sanguíneo (figura 1).



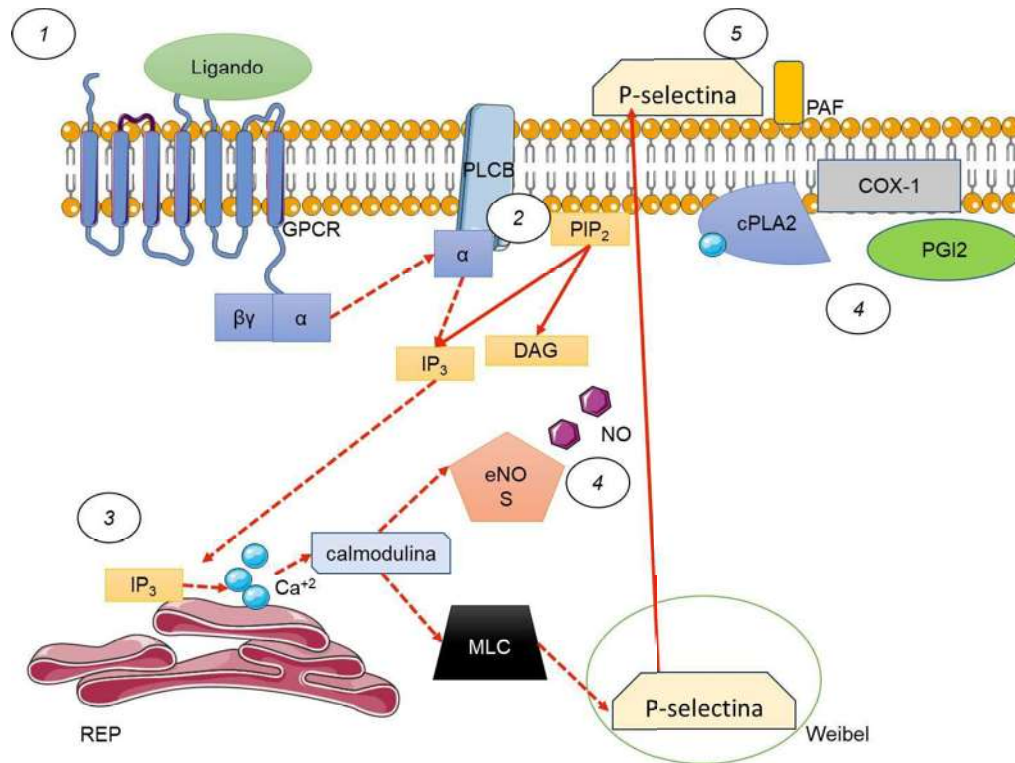
**Figura 1. Angiogénesis por brote angiogénico y sin brote.** La figura muestra la angiogénesis en el saco vitelino de codorniz de 3 días de maduración. Flechas negras: señalan el punto de inicio de la angiogénesis no brotante. Flechas blancas: señalan el punto de inicio de la angiogénesis brotante. Ambos procesos ocurren simultáneamente (Risau, 1997).

### **I.3 Endotelio vascular**

El endotelio vascular es la capa más interna de los vasos sanguíneos, consiste en una capa de células endoteliales recubierta de matriz extracelular y se rodea de células muro o pericitos (Chang, 2022). El endotelio cumple funciones importantes en la regulación del tono vascular y en la distribución del oxígeno y nutrientes, pero también lleva a cabo procesos importantes relacionados con el sistema inmunológico, como la respuesta inflamatoria; además, es el principal exponente para poder llevar a cabo la angiogénesis. Para que inicie el proceso inflamatorio o la angiogénesis, el endotelio vascular necesita llevar a cabo un proceso conocido como activación endotelial.

La activación endotelial consiste en la expresión de moléculas de adhesión y selectinas en la superficie celular, liberación de quimiocinas, óxido nítrico (NO) e interleucinas al medio extracelular, así como la producción de factores de crecimiento (Pober, 2002). La activación endotelial puede darse por dos tipos (I y II), dependiendo de la molécula activadora. Tipo I (figura 2): Se inicia mediante el estímulo de receptores de proteínas G (RPG) asociados a la membrana celular y se caracteriza por ser una respuesta rápida. Paso 1: El ligando del RPG se une al receptor liberando la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, lo que estimula la activación de la enzima fosfolipasa  $c\beta$  (PLCB). Paso 2: La PLCB activada rompe al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en el tercer carbono, formando el diacilglicerol

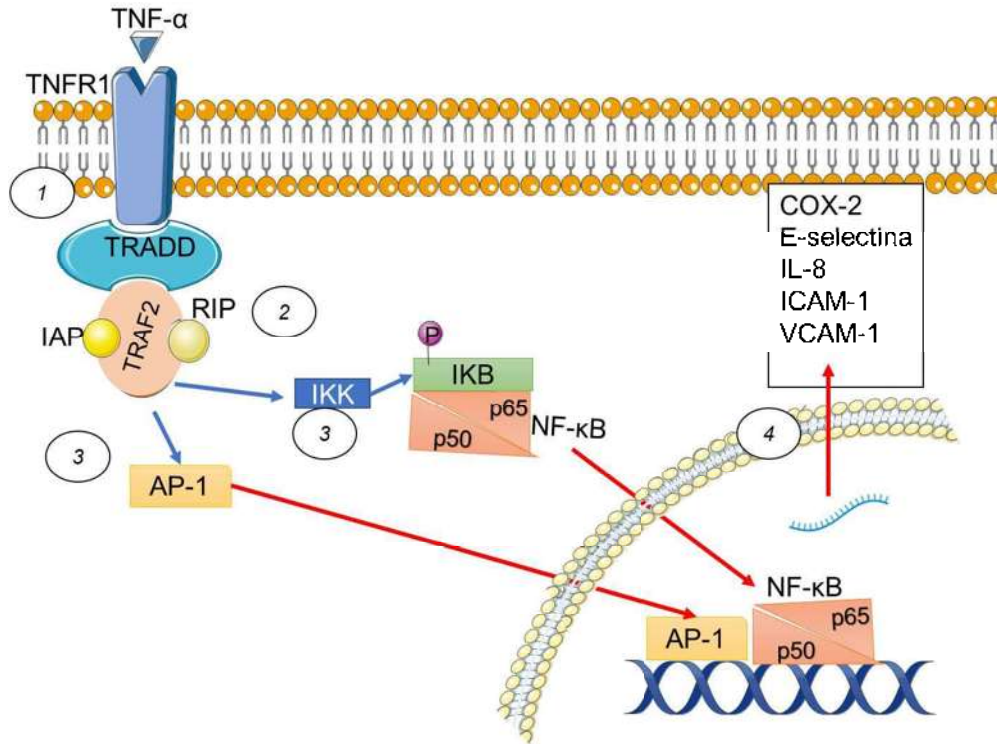
e inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Paso 3: El IP<sub>3</sub> se transporta al retículo endoplasmático y estimula la liberación de calcio (Ca<sup>2+</sup>) al citoplasma. Paso 4: El Ca<sup>2+</sup> liberado activa a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOs) para producir NO, y a su vez el Ca<sup>2+</sup> estimula la producción de ácido araquidónico para inducir la producción de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) mediante la estimulación de la ciclo-oxigenasa 1 (COX-1) (Poher, 2002). Paso 5: La activación culmina en la expresión del factor de activación plaquetaria (PAF) y de P-selectina en la superficie de la membrana celular. Además, se favorece la activación de factores de transcripción como NF-κB para la transcripción de genes involucrados en la proliferación, supervivencia, crecimiento y angiogénesis (Melincovici et al., 2018).



**Figura 2. Activación endotelial tipo 1.** La activación inicia mediante el estímulo de un ligando inflamatorio al unirse a un GPCR, el cual inicia una cadena de señalización para dar pie a la activación de la fosfolipasa PLCB y producir IP<sub>3</sub>. El IP<sub>3</sub> se translocará al REP para estimular la liberación de Ca<sup>2+</sup>. El Ca<sup>2+</sup> liberado activará a la calmodulina para activar la producción de NO mediante eNOS, así como la liberación de la P-selectina contenida en los corpúsculos de Weibel.

GPCR: receptor acoplado a proteína G. cPLA2 Fosfolipasa C2. COX-1: Ciclo oxigenasa 1. PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato. eNOS: Oxido nítrico sintasa endotelial. IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-trifosfato. PGI<sub>2</sub>: prostaciclina. DAG: Diacil glicerol. PAF: factor de activación plaquetaria. MLC: Cadena ligera de mielina. REP: Retículo endoplásmico. (Modificado de Pober, 2002; Melincovici et al., 2018).

Por otro lado, la activación del endotelio tipo II (figura 3) se inicia mediante la activación de receptores para TNF- $\alpha$  e IL-1 y es tardía. Paso 1: El TNF- $\alpha$  al ser reconocido por el TNFR-1 genera que el dominio de muerte (TRADD) se una a TNFR-1 en la región intracelular. Paso 2: Se recluta la proteína de interacción con el receptor serina/treonina kinasa (RIP1) y finalmente se une al receptor del factor de necrosis tumoral II (TRAF2). Paso 3: Culmina en la activación de la proteína activadora 1 (AP-1) y de NF- $\kappa$ B (Wang et al., 2018). De manera similar cuando la IL-1 es reconocida por ILR1 se recluta MyD88 y TIRAD. Posteriormente, IRAK1 y 4 se unen al complejo para que finalmente TRAF6 estimule a la proteína activadora 1 (AP-1) y NF- $\kappa$ B). Paso 4: En este tipo de activación se transcriben los genes de COX-2 para producir prostaciclina. Se favorece el citoesqueleto y la expresión de E-selectina, la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), así como genes involucrados en la supervivencia, crecimiento y angiogénesis (Lee et al., 2021).



**Figura 3. Activación endotelial tipo 2.** Inicia cuando el TNF- $\alpha$  se une al receptor TNFR1, lo que favorece la unión de TRADD a la región citosólica del receptor. Se atraen posteriormente RIP e IAP. Este complejo activará IKK para que fosforile I $\kappa$ B y puedan liberar las subunidades de NF- $\kappa$ B. Una vez libre NF- $\kappa$ B, este se transloca al núcleo junto con AP-1 y se inicia la transcripción de ARNm para producir E-selectina, IL-8, Cox-2 y moléculas de adhesión. TRADD: Dominio de muerte; RIP1: Proteína de interacción con el receptor serina/treonina quinasa, TRAF2: Receptor del factor de necrosis tumoral II; AP-1: proteína activadora 1; NF- $\kappa$ B: Factor nuclear kappa B. (Modificado de Wang et al., 2018; Lee et al. 2021).

#### I.4. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) cumple con la función de incrementar la permeabilidad vascular, promueve la migración celular y posee actividad anti-apoptótica y mitogénica. Esta molécula se produce en células endoteliales, células del sistema inmune innato (monocitos, macrófagos, linfocitos) y por células tumorales. En humanos se han descrito 6 isoformas principales (VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF), las cuales cumplen

diferentes funciones asociadas a procesos angiogénicos y no angiogénicos en diversas células (Melincovici et al., 2018). El VEGFA representa la principal molécula estimuladora de la angiogénesis. Presenta 232 aminoácidos y una masa molecular de 27,042 kDa. Se forma a partir del procesamiento de 8 exones y 7 intrones del ARN heterogéneo nuclear, lo cual por splicing alternativo genera 9 variedades distintas de VEGFA; sin embargo, las más estudiadas son las isoformas VEGFA<sub>165</sub> y VEGFA<sub>165b</sub> por su relevancia en la angiogénesis fisiológica como angiogénesis patológica (Melincovici et al., 2018).

Se ha descrito que, en algunas patologías inflamatorias, como en artritis o en crecimientos tumorales, la alta producción del VEGF estimula el crecimiento descontrolado de los vasos, además de estimular el desarrollo de estructuras vasculares deficientes, generando con esto el desarrollo de metástasis en el caso de cáncer o favoreciendo estadios proinflamatorios (Elshabrawy et al., 2016). Gracias a lo anterior, varios tratamientos anticancerosos se han dirigido a inhibir la actividad del VEGF, y de la misma manera se han buscado alternativas para regular su expresión y actividad en diversas patologías inflamatorias (Viallard & Larrivé, 2017).

El VEGF puede fungir como ligando de 3 receptores tipo tirosina-quinasa, los cuales son VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3, y algunas de sus isoformas pueden interactuar con NP-(neuropilina)1 y NP-2 (Ferrara et al., 2003). El VEGFR1, también conocido como Flt-1 (por sus siglas en inglés, fms-like tyrosine kinase), resulta ser el receptor con mayor afinidad al VEGF; sin embargo, esta interacción se asocia principalmente a la migración de células endoteliales (EC), y se ha descrito que favorece procesos de angiogénesis patológica (Chung & Ferrara, 2011).

El VEGFR2, nombrado KDR o Flk-1 (por sus siglas en inglés, kinase insert domain receptor (KDR) en humanos y fetal liver kinase 1 (Flk-1) en ratones, respectivamente), tiene un rol relevante en la supervivencia de las ECs, generando un efecto antiapoptótico, además es el receptor más importante al inicio de la

angiogénesis, ya que activa a las integrinas, rompe las uniones intercelulares e inicia el proceso de migración y proliferación celular (Ferrara et al., 2003). Gracias a su influencia en el proceso angiogénico, ha sido sugerido como otro blanco terapéutico en patologías relacionadas a la angiogénesis alterada, principalmente en tratamientos contra tumores sólidos (Chung & Ferrara, 2011).

El VEGFR3, o Flt-4 (por sus siglas en inglés, Fms-like tyrosine kinase 4), es el receptor que está asociado al desarrollo de vasos linfáticos y tiene importancia en el desarrollo embrionario. De los tres principales receptores del VEGF, este no tiene relevancia en el contexto de la angiogénesis en adultos; sin embargo, se ha relacionado con procesos inflamatorios y el crecimiento de tumores (Witmer et al., 2001).

### **I.5. Patologías asociadas a la angiogénesis**

Existen patologías principalmente relacionadas con procesos inflamatorios, que pueden beneficiarse con el proceso angiogénico. Lo anterior se debe a que una gran cantidad de moléculas iniciadoras de la inflamación estimulan de la misma manera el inicio de la angiogénesis, además de que ambos procesos requieren de la activación endotelial para iniciar (Medina Torres, 2017).

Una vez que el endotelio es activado, se expresan en la superficie celular selectinas (P-selectina y E-selectina), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y se secretan al medio interleucinas proinflamatorias (IL-1, IL-6), quimiocinas (IL-8), óxido nítrico (NO) y factores de crecimiento (EGF (factor de crecimiento epidérmico)), VEGF, PDGF (factor de crecimiento de plaquetas)) (Pober, 2002).

Dependiendo del tipo de alteración en el proceso angiogénico, se pueden dividir las patologías relacionadas con la angiogénesis en: A) Patologías asociadas al aumento en la angiogénesis, y B) Patologías asociadas a la disminución en la angiogénesis. Las primeras incluyen un aumento en la respuesta inflamatoria y en la producción del VEGF, PDGF y TGF- $\beta$ ; se presentan vasos con anomalías

estructurales y funcionales debido a la rápida estimulación del inicio de la angiogénesis (Patan 2000). Dentro de estas patologías se encuentra la artritis reumatoide, la psoriasis, la retinopatía diabética y el crecimiento tumoral; siendo el crecimiento de tumores y metástasis las enfermedades más estudiadas en este grupo (Kawsar et al., 2010; Ponnoth & Jamal Mustafa, 2011). De acuerdo al INEGI, en 2018 se reportaron en México 83,476 fallecimientos relacionados con el cáncer, por lo que es importante señalar que de los 200 tipos de cáncer reportados, el 60% de ellos se relaciona con un aumento en la producción del VEGF y afecciones angiogénicas.

Por otro lado, los problemas de cicatrización, en algunos casos se asocian a una regulación negativa de la angiogénesis (Jiménez-Andrade & González-Espinosa, 2011), es decir, una disminución en el proceso. En el caso de México, esto representa una gran problemática ya que este tipo de padecimiento se presenta en personas con diabetes (Martin et al., 2003). De acuerdo a datos del INEGI, aproximadamente el 10% de las personas con diabetes desarrollarán problemas en las extremidades, lo cual llevará a la amputación del miembro en una gran cantidad de pacientes.

## **I.6. Tratamientos para la angiogénesis**

Debido a la relación de la angiogénesis, o sus moléculas precursoras, con diversas patologías se han buscado tratamientos dirigidos a la regulación del proceso, ya sea para aumentarla o disminuirla (Ramjiawan et al., 2017).

Actualmente, no hay medicamentos aprobados por la FDA (por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) para estimular la angiogénesis; sin embargo, se ha propuesto el uso de péptidos antimicrobianos o compuestos derivados de estos para estimular la producción del VEGF en procesos de cicatrización, como es el caso del péptido sintético IDR-1018 (Marín-Luevano et al., 2018; Trujillo et al., 2017), el cual presentó actividad estimulando la cicatrización en modelos murinos.

Adicionalmente, el uso de productos derivados de plantas se ha sugerido como tratamiento; tal es el caso de la asperosaponina VI proveniente de la planta *Dipsacur asper*, la cual es usada en la medicina tradicional china para favorecer el proceso de cicatrización (Wang et al., 2018).

Por otro lado, actualmente solo se encuentran en el mercado pocos productos aprobados para inhibir la angiogénesis, y en su mayoría van dirigidos a inhibir el crecimiento de tumores cancerosos al ser usados en conjunto con quimioterapias (Li et al., 2017). Dentro de los principales fármacos destacan los anticuerpos monoclonales Bevacizumab (Avastatina), Aflibercept, Pegabtanib y Ranibizumab, cuya acción va dirigida a inhibir directamente la acción del VEGF, o Sunitinib o sorafenib que inhiben la activación del receptor VEGFR2 evitando la activación de la vía del VEGF (Melincovici et al., 2018). Adicionalmente, otros fármacos como Talidomida o endostatina se usan para inhibir la vía del VEGF. En la tabla 1 se resume el uso de los tratamientos más usados y el tipo de cáncer en que están aprobados.

**Tabla 1 Medicamentos aprobados para inhibir la angiogénesis**

| <b>Fármaco</b>              | <b>Aprobado para:</b> | <b>Acción</b>  |
|-----------------------------|-----------------------|--|
| Talidomida                  | Mieloma múltiple      | Inhibe al VEGF   |
| Bebacizumab<br>(Avastatina) | Cáncer colon-rectal   | Anticuerpo contra el VEGF, impide la unión al receptor               |
| Erlotinib (Tarceva)         | Cáncer pulmonar       | Bloquea al EFG, VEGF, bFGF y TGF- $\alpha$                           |
| Endostatina                 | Cáncer pulmonar       | Aumenta la producción de trombospondina-1 (potente anti angiogénico) |
| Ranibizumab                 | Degeneración macular  | Bloquea la unión del VEGF al receptor                                |

A pesar de la existencia de medicamentos para regular la angiogénesis, se está en búsqueda de nuevos tratamientos que presenten mejor actividad, disminuyendo los efectos secundarios adversos y con menor costo de producción. En este sentido se propone el uso de productos derivados de plantas, ya que existe una gran variedad de compuestos provenientes de estas que presentan múltiples actividades de interés biotecnológico, tal como pueden ser los péptidos antimicrobianos.

### **I.7. Péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos son pequeñas moléculas de origen proteico cuya principal actividad se asocia al combate de microorganismos, y estos se encuentran presentes en todos los organismos vivos (Guzmán-Rodríguez et al., 2015). En el caso de los humanos se encuentran 3 familias de péptidos antimicrobianos: las catelicidinas, histatinas y defensinas (Rivas-Santiago et al., 2006). En otros organismos, como las plantas, se encuentran 12 familias diferentes, las cuales son: Tioninas, Defensinas, Ciclotidos, Tipo-Knotina, Seferdinas, MBP-1, Ib-AMPs, LTP, Esnaquinas, Tipo- Heveínas, Albuminas 2S y  $\beta$ -Barrelinas (Guzmán-Rodríguez et al., 2015).

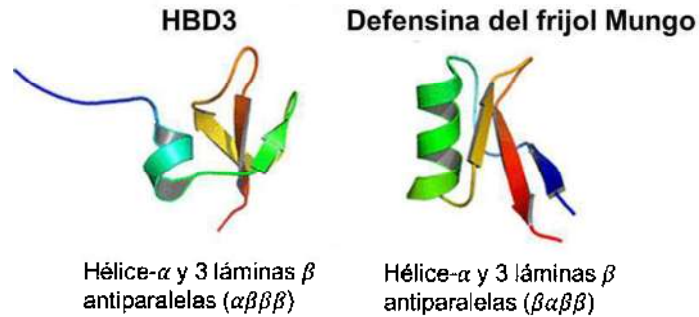
Se ha reportado que los péptidos antimicrobianos poseen actividades diversas dependiendo de la concentración a la cual se usen, teniendo propiedades citotóxicas e inmunomoduladoras (Nawrot et al., 2014). De manera interesante, se reportó que algunos péptidos provenientes de organismos no mamíferos, como insectos, anfibios o plantas pueden generar algún efecto sobre el sistema inmune de los vertebrados. Dentro de las actividades inmunomoduladoras que se les ha asociado a los péptidos se encuentran: Inhibición de la síntesis (replicación) de ADN, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño al ADN, cambios

en el perfil metabólico, inhibición del crecimiento tumoral y angiogénesis (Xie et al., 2020).

Debido a la gran variedad de actividades reportadas para estos péptidos, se han propuesto como terapias alternativas para diversas patologías. Además, ya que algunos péptidos son altamente conservados, comparten características estructurales entre familias pertenecientes a diferentes organismos, tal como es el caso de las defensinas, las cuales se encuentran presentes en mamíferos, plantas e insectos (Nawrot et al., 2014). Por estas similitudes estructurales se ha propuesto a las defensinas provenientes de plantas e insectos como posibles moléculas moduladoras en el tratamiento de patologías en mamíferos.

## **I.8. Defensinas**

Las defensinas pertenecen a un pequeño grupo conservado de péptidos antimicrobianos presentes en mamíferos, plantas e insectos (Patel & Akhtar, 2017). De manera general son péptidos catiónicos que se caracterizan por poseer una estructura  $CS\alpha\beta$ , y constan de una hélice  $\alpha$  y tres láminas  $\beta$  antiparalelas en una configuración  $\beta\alpha\beta\beta$  o  $\alpha\beta\beta\beta$  en el caso de las defensinas de plantas o de mamíferos, respectivamente (figura 4) (Ganz, 2003). Esta estructura se estabiliza mediante enlaces disulfuro intramoleculares entre las 6 u 8 cisteínas presentes en su estructura, formando de 3 a 4 puentes disulfuro.



**Figura 4. Ejemplos de defensinas.** Izquierda: Beta defensina humana 3. Se muestra el acomodo  $\alpha\beta\beta\beta$  de las defensinas humanas. Derecha: Defensina del frijol mungo. Se muestra el acomodo de  $\beta\alpha\beta\beta$ . Figura tomada y modificada de (Jenssen et al., 2006; Nawrot et al., 2014).

En humanos existen 2 subfamilias de defensinas, las  $\alpha$ -defensinas y las  $\beta$ -defensinas. Las primeras presentes en los neutrófilos inhiben la proliferación inducida por el VEGF e inhiben la formación de capilares. Las  $\beta$ -defensinas son péptidos con similitud a las quimiocinas y pueden regular el proceso inflamatorio (Donnarumma et al., 2016).

En el caso de las plantas, las defensinas se clasifican en dos clases dependiendo de la estructura de las proteínas precursoras de las que son derivadas, estas son la clase I y clase II. Las defensinas vegetales de clase I comprenden una secuencia señal del retículo endoplasmático y un dominio de defensina maduro. Las defensinas de clase II se producen a partir de precursores más grandes con una secuencia de señal del retículo endoplasmático junto con un dominio de defensina maduro (Guzmán-Rodríguez et al., 2015).

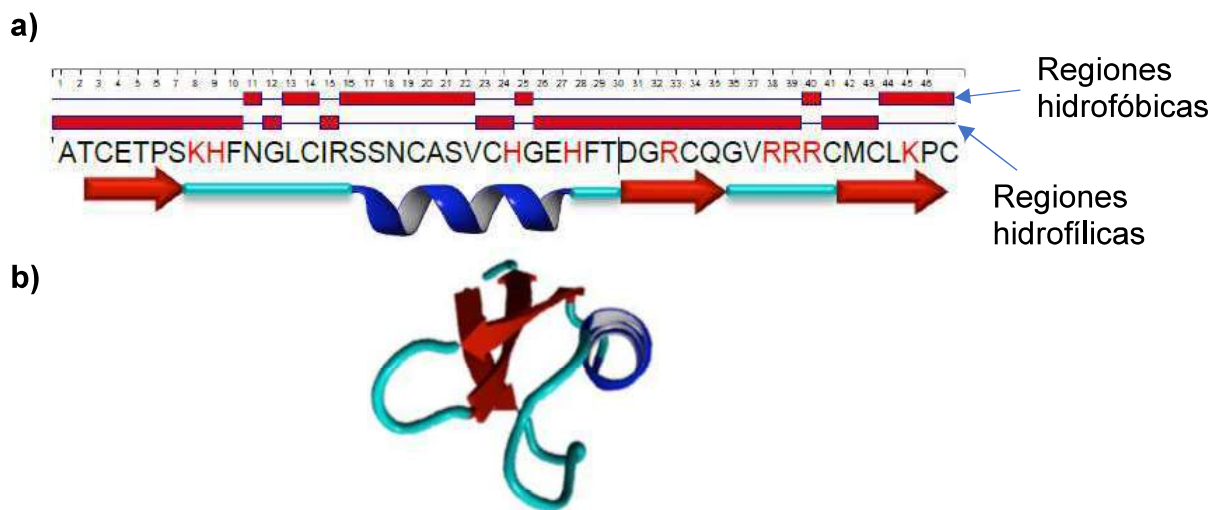
En el grupo de trabajo se han analizado algunas propiedades de dos defensinas de plantas, PaDef proveniente del aguacate nativo mexicano *Persea americana* var. *drymifolia*, y  $\gamma$ -tionina obtenida del chile habanero *Capsicum chinense*. Ambos péptidos han mostrado propiedades citotóxicas además de las antimicrobianas.

## I.9. PaDef

PaDef es un péptido maduro de 47 aminoácidos con la capacidad de formar 4 puentes disulfuro (Figura 5), proveniente de la pulpa del aguacate nativo mexicano *P. americana* var. *drymifolia* y pertenece al grupo de las defensinas de clase 1. La secuencia de PaDef es la siguiente:

NH<sub>2</sub>-ATCETPSKHFNGLCIRSSNCASVCHGEHFTDGRRCQGVRRRCMCLKPC-

COOH. Se ha reportado una actividad contra bacterias Gram (+) y Gram (-), además de generar efectos citotóxicos contra las líneas de leucemia K562 (97 µg/mL) (Jiménez-Alcántar et al., 2022) y cáncer de mama MCF-7 (142 µg/mL) (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). De manera interesante, este péptido no presenta citotoxicidad sobre células no cancerosas; sin embargo, aún no se ha descrito una actividad inmunomoduladora por parte de éste.

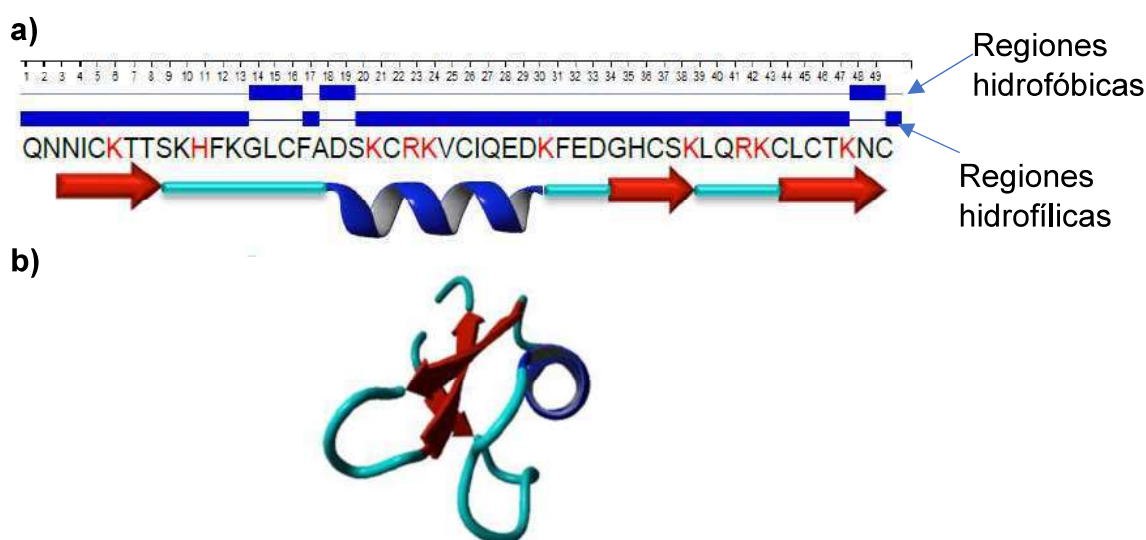


**Figura 5. Análisis estructural de la defensina PaDef.** a) Secuencia del péptido y la distribución de las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas; en rojo se señalan los residuos de aminoácidos cargados positivamente. b) Modelo de la estructura completa del péptido. Análisis realizado con el Software DNASTARLasergene/ Protean (Guzmán-Rodríguez, 2016).

## I.10. $\gamma$ -tionina

$\gamma$ -tionina es un péptido maduro de 50 aminoácidos (figura 6), perteneciente a las defensinas de clase 1, con la secuencia siguiente:

NH<sub>2</sub>-QNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCIQEDKFEDGHCSKLQRKCLCTKNC-COOH. Este péptido presenta efectos antimicrobianos contra *Candida albicans*, además es citotóxico sobre la línea de leucemia K562 al inducir el proceso de apoptosis (290  $\mu$ g/mL) y genera modificaciones epigenéticas (Flores-Álvarez et al., 2023). Adicionalmente, presentó efectos inmunomoduladores en células de epitelio mamario bovino (100 ng/mL) induciendo efectos pro-inflamatorios.



**Figura 6. Análisis estructural de la defensina  $\gamma$ -tionina.** a) Secuencia del péptido y la distribución de las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas; en rojo se señalan los residuos de aminoácidos cargados positivamente. b) Modelo de la estructura completa del péptido. Análisis realizado con el Software DNASTARLasergene/ Protean (Guzmán-Rodríguez, 2016).

## II. Antecedentes

En el grupo de investigación se ha trabajado con diversos PAPs, tal como las defensinas PaDef (de aguacate nativo mexicano, *Persea americana*) y  $\gamma$ -tionina (de chile habanero, *Capsicum chinense*), los cuales han mostrado una actividad citotóxica sobre células cancerosas. PaDef induce apoptosis sobre células de la línea K562 (leucemia mielógena crónica caucásica humana), la cual se relaciona con la activación de la caspasa 8 (Jiménez-Alcántar et al., 2022), y también sobre células MCF-7 de cáncer de mama, mediante la inducción de apoptosis intrínseca (Guzmán-Rodríguez et al., 2016). Por su parte,  $\gamma$ -tionina induce la apoptosis de la línea de leucemia K562 a través de un mecanismo independiente de caspasas ( $IC_{50}$ = 290  $\mu$ g/mL), además de generar modificaciones epigenéticas (Jiménez-Alcántar et al., 2022; Flores-Alvarez et al., 2023); y también ejerce efectos inmunomoduladores en células de epitelio mamario bovino a concentraciones 1000 veces menores (100 ng /mL) (Díaz-Murillo et al., 2016). Sin embargo, se desconoce si estos PAPs pueden ejercer alguna actividad reguladora sobre las células endoteliales, protagonistas del proceso angiogénico.

### **III. Justificación**

La angiogénesis hace referencia a la formación de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, es un proceso fisiológico asociado a procesos como la reparación de heridas y el mantenimiento de los tejidos, requiere de factores pro y anti angiogénicos para mantenerse regulada y en control. Sin embargo, cuando la regulación no ocurre de manera adecuada puede favorecer la progresión de algunas patologías, principalmente aquellas relacionadas con los procesos inflamatorios.

Por lo anterior, la regulación de la angiogénesis se ha usado como una estrategia para controlar diversas patologías. En este sentido, el uso de péptidos antimicrobianos surge como una posible estrategia de regulación angiogénica, debido a que algunas defensinas endógenas de mamíferos presentan actividades reguladoras de este proceso. Por lo que, en el presente trabajo se evaluaron las propiedades regulatorias de dos defensinas provenientes de plantas, PaDef (aguacate) y  $\gamma$ -tionina (chile) sobre algunos eventos relacionados con la angiogénesis, usando como modelo dos líneas celulares de endotelio: 1) las células EA.hy926 de origen humano, y 2) las células BUVEC de origen bovino.

## **IV. Hipótesis**

Los péptidos antimicrobianos PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) y  $\gamma$ -tionina (*Capsicum chinense*) inhiben eventos relacionados con la angiogénesis inducida por el VEGF *in vitro* en células endoteliales.

## **V. Objetivos**

### **1. General**

Evaluar el efecto de los péptidos antimicrobianos PaDef (*P. americana* var. *drymifolia*) y  $\gamma$ -tionina (*C. chinense*) sobre funciones angiogénicas inducidas por el VEGF en células endoteliales.

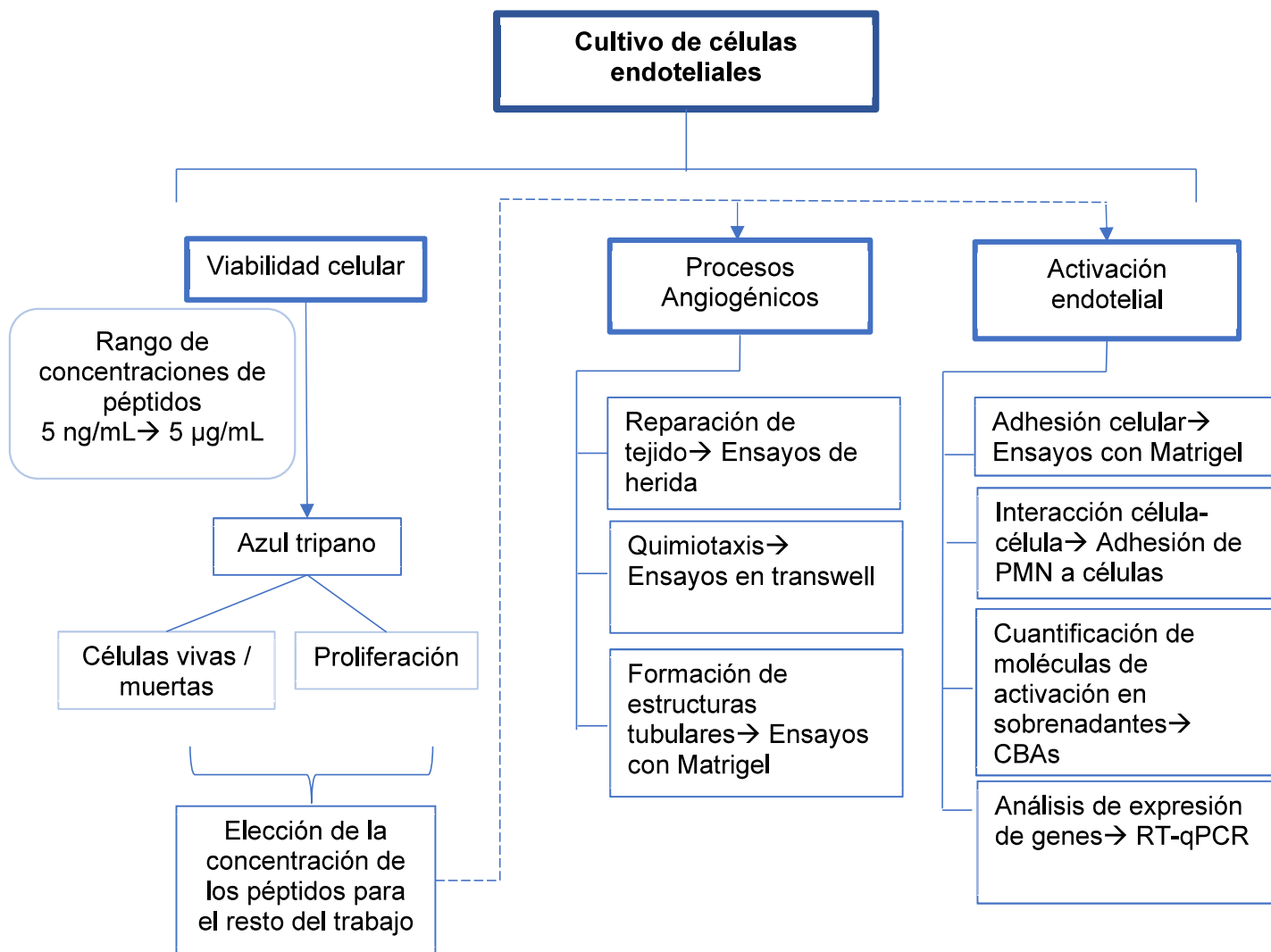
### **2. Específicos**

VII.2.1 Determinar el efecto de las defensinas  $\gamma$ -tionina y PaDef sobre la viabilidad de células endoteliales.

VII.2.2 Evaluar el efecto de las defensinas  $\gamma$ -tionina y PaDef sobre procesos angiogénicos estimulados por el VEGF sobre células endoteliales.

VII.2.3 Determinar si las defensinas  $\gamma$ -tionina y PaDef regulan la activación endotelial.

## VI. Estrategia experimental



## VII. Resultados

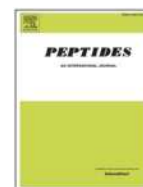
Los resultados generados en el presente trabajo se presentan en 4 capítulos:

- 1- El capítulo I corresponde al artículo de investigación:  
“The plant defensins PaDef and  $\gamma$ -thionin inhibit the endothelial cell response to VEGF”.
- 2- El capítulo II corresponde al manuscrito titulado:  
“Las defensinas de plantas PaDef y  $\gamma$ -tionina inhiben la activación endotelial inducida por VEGF en células EA.hy926”.
- 3- El capítulo III corresponde al manuscrito del protocolo titulado:  
“Validación de un método para evaluar la adhesión de células PMN a células endoteliales por citometría de flujo”.
- 4- El capítulo IV corresponde al artículo de divulgación:  
“Vasos sanguíneos, las carreteras de mi cuerpo”.

**1. Capítulo I. Las defensinas de plantas, PaDef y  $\gamma$ -tionina inhiben la respuesta al VEGF en células endoteliales.**

**The plant defensins PaDef and  $\gamma$ -thionin inhibit the endothelial cell response to VEGF.**

**Falcón-Ruiz, E. A., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2023).** The plant defensins PaDef and  $\gamma$ -thionin inhibit the endothelial cell response to VEGF. *Peptides*, 165 (February). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171008>



# The plant defensins PaDef and $\gamma$ -thionin inhibit the endothelial cell response to VEGF

Elba Andrea Falcón-Ruiz, Joel Edmundo López-Meza, Alejandra Ochoa-Zarzosa \*

Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, C.P. 58893 Morelia, Michoacán, Mexico

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Angiogenesis  
Vascular endothelial growth factor  
Antimicrobial peptides  
Plant defensins  
Endothelial cells

## ABSTRACT

Angiogenesis is involved in wound repair and tissue maintenance but is associated with diverse diseases. Pro-angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) regulate this process. Therefore, searching for treatments to inhibit or promote angiogenesis is attractive. Reports from our group showed that plant antimicrobial peptides (PAPs) PaDef from avocado and  $\gamma$ -thionin from habanero pepper are cytotoxic on cancer cells. However, their functions as angiogenic regulators are unknown. In this work, we evaluate the effect of PaDef and  $\gamma$ -thionin on the angiogenic processes of two different endothelial cell lines: bovine endothelial cells (BUVEC) and the human endothelial cell line EA.hy926. The results showed that VEGF (10 ng/mL) stimulated the BUVEC ( $40 \pm 7\%$ ) and EA.hy926 cell proliferation ( $30 \pm 9\%$ ); however, peptides (5–500 ng/mL) reverted this effect. Besides, VEGF increased the migration of BUVEC ( $20 \pm 8\%$ ) and EA.hy926 cells ( $50 \pm 6\%$ ), but both PAPs (5 ng/mL) inhibited the VEGF stimulus (100%). Furthermore, DMOG 50  $\mu$ M (an inhibitor of HIF-hydroxylase) was used in BUVEC and EA.hy926 cells to determine the effect of hypoxia on VEGF and peptide activities. The DMOG reverted the inhibitory action of both peptides (100%), indicating that peptides act through a HIF-independent pathway. Also, the PAPs do not affect the tube formation but decrease it in EA.hy926 cells stimulated with VEGF (100%). Additionally, docking assays showed a possible interaction between PAPs and the VEGF receptor. These results suggest that plant defensins PaDef and  $\gamma$ -thionin are potential angiogenic modulators of the VEGF activity on endothelial cells.

## 1. Introduction

The vascular endothelium (the inner layer of blood vessels) is relevant to the immune response regulating inflammation and angiogenesis [1,3,6]. Angiogenesis is associated with wound healing and tissue maintenance. Diverse molecules, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin (IL)-6, IL-8, and angiogenin, favor angiogenesis. Meanwhile, metalloproteinase inhibitors and endostatin inhibit it [12,30]. Also, angiogenesis is related to the inflammatory process [18,25]; but in some pathologies, this process is altered (psoriasis, diabetes, and tumor growth) [18,22,26,36].

Due to the tight relationship between inflammation and angiogenesis, treatments focused on regulating blood vessel formation to control some pathologies have been developed. For example, Tarceva or Avastin, drugs approved by the FDA, reduce the angiogenesis induced by VEGF and up-regulate the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in some tumors [11]. Besides, some synthetic peptides favor wound healing in

murine models throughout VEGF production [19,21]. However, there is no FDA-approved drug that stimulates the angiogenesis process.

Antimicrobial peptides (AMPs) are present in all organisms. These peptides are part of the innate immune system and have mainly antibiotoxic properties [31,35]. Nevertheless, AMPs have different activities, such as cytotoxicity, DNA synthesis inhibition, immunomodulatory properties, and angiogenesis regulation [13,16,19,29]. An attractive group of AMPs is the defensins of animals, insects, and plants [14,28]. Defensins have shown similarities that favor their use as exogenous peptides to treat several pathologies and their influence on the immune system [18]. For example, human beta-defensin 2 (HBD2) stimulates the response of the vascular endothelium inducing monocyte adhesion, exacerbating the inflammatory response [5].

Plant defensins are cationic PAPs with 45–55 aa residues and have eight cysteine residues that form 4 disulfide bridges [17]. They are expressed in the seeds, leaves, roots, barks, pods, tubers, fruits, and flower organs. The main functions of these PAPs involve antifungal and

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [alejandra.ochoa@umich.mx](mailto:alejandra.ochoa@umich.mx), [ochoaz@umich.mx](mailto:ochoaz@umich.mx) (A. Ochoa-Zarzosa).

antibacterial activities; however, some defensins have a specific toxic effect on cancer cells [16]. Previously, our group showed that PAPs PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) and  $\gamma$ -thionin (*Capsicum chinense*) are cytotoxic on several cancer cells (breast and leukemia) through apoptosis [17,33]. Also, both PAPs showed immunomodulatory activities (data unpublished for PaDef) [10]. However, the role of these PAPs as angiogenesis regulators is unknown.

## 2. Material and methods

### 2.1. Peptides

The mature region of both peptides was chemically synthesized and obtained from BIOMATIK. PaDef (ATCETPSKHFNGLCIRSSNCASVCHGEHFTDGRQCQVRRRCMCLKPC, 47 aa, Genbank KC007441) [14], a defensin from *Persea americana* var. *drymifolia*; and  $\gamma$ -thionin (QNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCIQEDKFEDGHCSKLRKCLCTKNC, 50 aa, Genbank AF128239), a defensin from *Capsicum chinense* were the peptides employed. The peptides (962  $\mu$ M) were resuspended in 20 % dimethyl sulfoxide (DMSO) and then air oxidized for five days at room temperature for disulfide bond formation [10].  $\gamma$ -thionin and PaDef bond formation was confirmed by TOF-mass spectrometry, accordingly to previous reports from our group [10,15,16]. In addition, the biological activity of these peptides was confirmed (suggesting that their tri-dimensional structure is correct) by inhibiting *Candida albicans* ATCC 10231 growth (data not shown). The peptide concentration range used in this study was 5 ng/mL to 5  $\mu$ g/mL, based on their immunomodulatory effects [10]. The final concentration of vehicle (DMSO) for all the experiments was 0.4 %, which was used as a control.

### 2.2. Cell cultures

For this work, we choose two well-characterized endothelial cell lines to analyze the effects of both peptides on angiogenesis events: The bovine endothelial cell line BVE-E6E7 (BUVEC) immortalized with the human papillomavirus type 16 E6E7 oncogene, and the human endothelial cell line EA.hy926 (kindly donated by Dr. Bruno Rivas-Santiago from Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Biomédica Zacatecas, Zacatecas, México). These two cell lines were selected based on their ability to respond to VEGF. Both cell lines have been employed as a model of endothelial cells to evaluate the angiogenesis process and VEGF-pathway-related mechanisms [7,27]. In addition, these cell lines of bovine and human origin represent a broad spectrum for the action of antimicrobial peptides. BUVEC cells do not need additional supplements for culture, growth factors, cofactors (heparin, ascorbic acid), or a particular culture substrate (fibronectin and gelatin) [9]. Otherwise, EA.hy926 (line established by primary fusion of human umbilical cord cells with clone A549) requires endothelial growth factors to maintain endothelial cell characteristics.

BUVEC were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM F12), Sigma), supplemented with 5 % fetal bovine serum (FBS), 5 % calf serum (Biowest), 100 U/mL penicillin, and streptomycin (Gibco). In addition, the human endothelial cell line EA.hy926 was routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM high glucose, Sigma), supplemented with 10 % FBS (Biowest), 100 U/mL penicillin, and streptomycin (Gibco), sodium pyruvate 1 mM, and endothelial growth supplement from bovine pituitary (3 mg/mL) (Sigma). Both cell lines were grown in an atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### 2.3. Cell viability and proliferation

The cell viability and proliferation ratio were assessed by trypan blue dye as described [14]. Briefly, cells (10 × 10<sup>3</sup> cells/well) were grown in 96-well plates for 24 h. Further, fresh medium without serum (for

BUVEC) or medium supplemented with 1 % of inactivated fetal calf serum (for EA.hy926) was added, and cells were incubated for 24 h. Then, the medium was replaced with 100  $\mu$ L of new medium containing PaDef,  $\gamma$ -thionin, VEGF, or a mixture of treatments, and cells were incubated for 24 h. The supernatant of the cells was kept to avoid the possibility of discarding viable detached cells. Then, cells were harvested with trypsin, and the supernatants were mixed with the collected cells. Then, 10  $\mu$ L of the cell suspension was mixed with 10  $\mu$ L trypan blue (0.4 %). Dead and viable cells were counted using a hemacytometer and an automated cell counter (Bio-Rad T20). Cell viability was registered as the number of live and dead cells. We also performed MTT assays, as previously reported [10], to corroborate trypan blue dye exclusion assay results (data not shown).

To determine the effect of VEGF and peptides on cell proliferation, we used different protocols to analyze possible synergic or antagonistic effects of peptides and VEGF (Fig. S1): (a) VEGF and the peptides (PaDef or  $\gamma$ -thionin) added at the same time; (b) PaDef or  $\gamma$ -thionin added for 24 h, and then VEGF added for 24 h; (c) VEGF added for 24 h, and then PaDef or  $\gamma$ -thionin added for 24 h. Also, we evaluated 3 concentrations of peptides (5 ng/mL, 500 ng/mL, and 5  $\mu$ g/mL) and one VEGF concentration (10 ng/mL).

Dimethylalxylglycine N-(Methoxyoxoacetyl)-glycine methyl ester (Sigma-Aldrich) (DMOG) 50–150  $\mu$ M was used to generate chemical hypoxia.

### 2.4. Wound healing assay

This assay was performed to assess the effect of PAPs on cell migration. The cells were cultured to confluence in a 24-well plate. A scratch simulating a wound was created with a 100  $\mu$ L pipette tip, forming an X. Cell debris was discarded with PBS washed, and cells were incubated in a medium without FBS for 22 h at 37 °C. Then, the medium was replaced with a fresh medium with 5  $\mu$ g/mL of mitomycin C (2 h). Further, the medium was replaced with PaDef,  $\gamma$ -thionin, VEGF treatment, or the mixtures and resuspended in a medium with 1 % heat-inactivated FBS. To estimate the wound closure, cell migration (area) was examined using an inverted microscope (Primo Vert, Zeiss) and recorded at 0, 8, 24, and 48 h. It was calculated and expressed as a percentage by comparing the areas measured at the different time points with the site at T0. Images of the wounds were taken at different positions and analyzed with the ImageJ software using the wound-healing tool. All experiments were performed three times, and 10 random fields of each condition were counted.

### 2.5. Tube formation assay

The formation of tube structures was assessed by matrigel induction. A 96-well plate was coated with 0.1 mL of matrigel (ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma Sigma-Aldrich) mixed with DMEM high glucose medium without serum (50:50) for EA.hy926 cells or with 0.1 mL of Matrigel mixed with Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM, Sigma) without serum (50:50) for BUVEC cells, and allowed to solidify at 37 °C for 30 min. EA.hy926 cells (3.5 × 10<sup>4</sup> cells/well) were seeded on the matrigel and cultured in DMEM with the different treatments (PaDef 5 ng/mL,  $\gamma$ -thionin 5 ng/mL, VEGF 10 ng/mL, or mixtures) for 8 h, and BUVEC cells (3.5 × 10<sup>4</sup> cells/well) were seeded for 24 h. The entire tube networks from 4 randomly chosen fields were selected and photographed under an inverted microscope (Primo Vert, Zeiss). The number of junctions formed between the tube structures was analyzed with the ImageJ software.

### 2.6. Transwell migration assay

The migration of EA.hy926 and BUVEC cells was evaluated using an insert of 5  $\mu$ m (Corning, USA), following the protocol described for the transwell inserts [38]. Briefly, 25 × 10<sup>3</sup> cells were seeded in the upper

chamber, while the lower chamber contained the treatments PaDef (5 ng/mL),  $\gamma$ -thionin (5 ng/mL), VEGF (10 ng/mL), or the mixtures in culture medium (DMEM high glucose for EA.hy926 cells, or F12 for BUVEC cells) without serum. In addition, VEGF was used as a positive control of migration. After 24 h, the upper chamber was washed twice with PBS. The membrane (insert) that contains the migrated cells was harvested and fixed in 4 % paraformaldehyde for 15 min at room temperature. The cells were then incubated with methanol for 10 min at room temperature and stained with crystal violet. The cells that did not migrate but remaining in the inner part of the insert were carefully removed with a cotton swab to avoid the quantification of falsely migrated cells. Finally, the cell migration was examined using an inverted microscope and photography (Primo Vert, Zeiss) to count the number of cells attached to the outer part of the membrane. All experiments were performed twice in duplicate, and 10 random fields were analyzed with ImageJ software.

### 2.7. Docking assays

The structures of molecules (VEGFR2: 3V2A; VEGFA: 2VPF) were obtained from RCSB Protein Data Bank (<https://www.pdb.org/>) and imported into AutoDockTools 1.5.6 for docking. We used AutoDockTools to process the proteins VEGFR2 and VEGFA. The modifications we made to the protein structure were: removing the ligands, correcting the protein structure, and eliminating the water molecules associated with the structure. For the ligands, the structures of the peptides (PaDef and  $\gamma$ -thionin) were obtained using the Swiss model, taking the basal structure reported [24]; the PDB format was imported to AutoDockTools, removing the rotatable torsions and adding Kollman charges. The PDBQT format was used to perform the docking by AutoDock-Vina and the blank screen CMD of the system. Blind analyses were performed [32]. Structures were visualized using PyMol (version 1.7.2.1).

### 2.8. Statistical analysis

The data were analyzed with PRISM 8.0.2 and JMP 6. Ink software by performing a *t*-student analysis. The results are reported as the mean  $\pm$  the standard error (S.E.), and the significance level was set at  $p < 0.05$ .

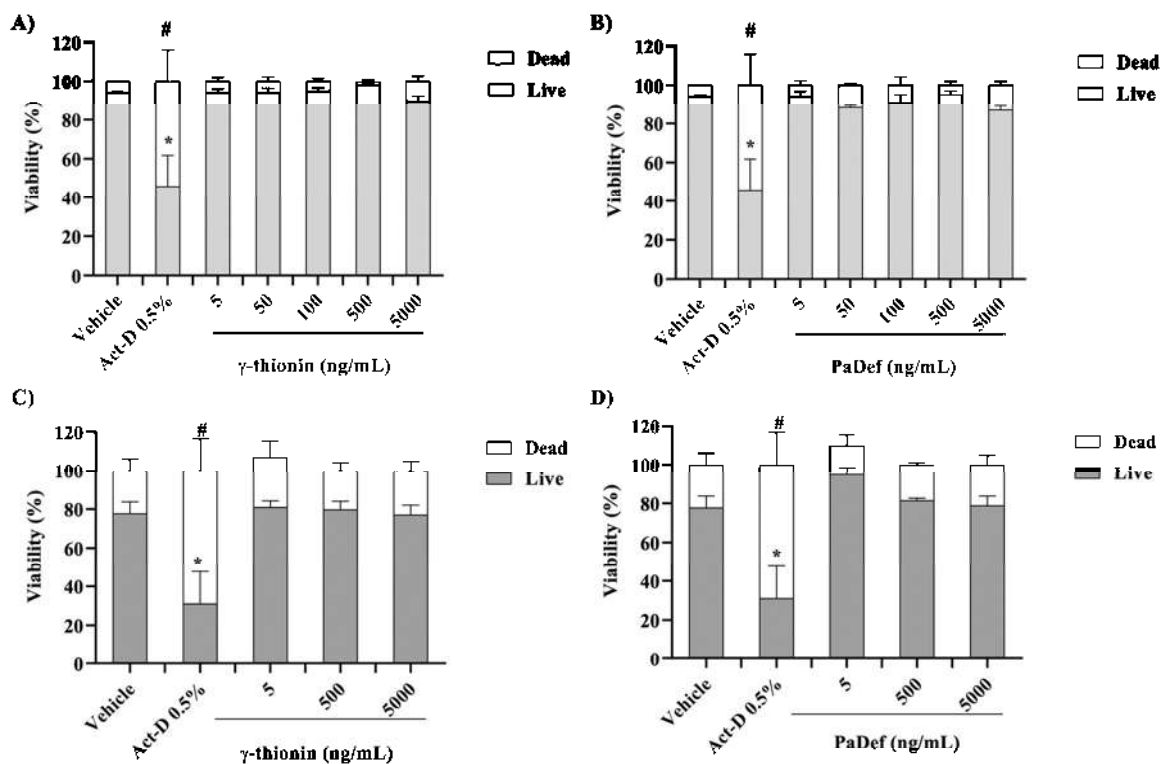
## 3. Results

### 3.1. PaDef and $\gamma$ -thionin did not affect the viability of endothelial cells

The effect of both peptides on cell viability was initially assessed in the BUVEC cell line. The cells were exposed to increasing concentrations of PaDef or  $\gamma$ -thionin (5 ng/mL–5  $\mu$ g/mL) for 24 h, and then cell viability was measured with trypan blue. Results showed that the peptides do not affect the BUVEC viability (Figs. 1A and 1B). According to these results, we only assessed the viability of EA.hy926 cells with 5 ng/mL, 500 ng/mL, or 5  $\mu$ g/mL of the peptides at 24 h. Data showed that the peptides do not affect EA.hy926 cell viability (Figs. 1C and 1D). Based on these results, the rest of the experiments were performed with 5 ng/mL, 500 ng/mL, or 5  $\mu$ g/mL of each peptide at 24 h.

### 3.2. PaDef and $\gamma$ -thionin inhibit the proliferative effect of VEGF on BUVEC and EA.hy926 cells

First, we assessed if the human VEGF induces BUVEC proliferation. The results showed that VEGF increased the number of cells; the more notable effect was observed at 10 ng/mL (40 %) (Fig. S2). According to it, further experiments were performed with VEGF 10 ng/mL. Next, we evaluated the VEGF and peptide interaction on endothelial cell proliferation using the following conditions (Fig. S1): (a) the VEGF and the peptides (separately) were added at the same time; (b) PaDef or  $\gamma$ -thionin was added by 24 h, and then VEGF was added by 24 h; (c) VEGF was added by 24 h, and then PaDef or  $\gamma$ -thionin was added by 24 h. The results showed that the peptides do not affect the BUVEC and EA.hy926



**Fig. 1.  $\gamma$ -thionin or PaDef does not affect endothelial cell viability.** The cell viability of BUVEC (A, B) and EA.hy926 cells (C, D) were assessed by trypan blue dye at 24 h. Act-D: Actinomycin D 0.5 %. Vehicle: DMSO 0.4 %. Data were analyzed by *t*-student. Each bar shows the mean of triplicates  $\pm$  S.E. \* and # indicate a significant difference in live and dead cells concerning the vehicle, respectively ( $p < 0.05$ ).

cell proliferation (Fig. 2). Although in BUVEC cells the treatment with PaDef 5 ng/mL seems to increase the proliferation, the statistical analysis didn't show significance compared with the vehicle. However, in BUVEC cells, both peptides reverted the VEGF stimulus in condition "a" for all concentrations tested (Figs. 2A and 2B). A similar result was observed in condition "b" (Figs. S3A and S3B), but in condition "c", the proliferation stimulated by VEGF was not affected (data not shown). According to the results with BUVEC, the assays with EA.hy926 cells were performed only with 5 ng/mL of peptides (PaDef or  $\gamma$ -thionin) and VEGF (10 ng/mL), as described above for condition "a". Similarly, the proliferation induced by VEGF was inhibited by both peptides (Fig. 2C), as observed in BUVEC cells; despite the increased cell mortality due to the lack of growth factors required for the culture of EA.hy926 cells.

### 3.3. PaDef and $\gamma$ -thionin inhibit the migration induced by VEGF in endothelial cells

Using wound-healing assays, we assessed the migration of BUVEC (Fig. 3A–C) and EA.hy926 cells (Fig. 3D–F) treated with PaDef or  $\gamma$ -thionin. None of the PAPs (5 ng/mL) affected the migration of both endothelial cells (Fig. 3); however, we observed that PAPs interfered with the migration induced by VEGF at 48 h (Fig. 3).

### 3.4. PaDef and $\gamma$ -thionin inhibit the chemotactic effect of VEGF

We performed a migration assay in a transwell chamber to determine if PaDef and  $\gamma$ -thionin affect the VEGF chemotactic effect (Fig. 4). VEGF increased the migration of BUVEC ( $\approx 2$  times) (Figs. 4A and 4C) and EA.hy926 cells ( $\approx 3$  times) (Figs. 4B and 4D) compared with serum-free medium. Peptides do not affect the cell migration of EA.hy926 (Fig. 4B), but in BUVEC  $\gamma$ -thionin decreased by 60 % the migration compared with serum-free medium (Fig. 4A). Noteworthy, when the peptides were mixed with the VEGF, the migratory effect induced by VEGF was inhibited in both cell types (Figs. 4A and 4B).

### 3.5. The induction of chemical hypoxia interferes with PaDef and $\gamma$ -thionin activity

Hypoxia is a relevant factor in stimulating angiogenesis. Hypoxia was induced in both cell lines with DMOG (50, 100, and 150  $\mu$ M) without affecting the cell viability (Fig. 5A and 5B). Therefore, we selected DMOG 50  $\mu$ M for the subsequent assays. BUVEC and EA.hy926 cells were treated with the peptides (5 ng/mL) and the VEGF (10 ng/mL) in a chemical hypoxia environment (DMOG 50  $\mu$ M), and cell proliferation was assessed. In the presence of DMOG, BUVECs treated with

the  $\gamma$ -thionin, and the  $\gamma$ -thionin-VEGF combination (Fig. 5C) and PaDef and PaDef-VEGF combination (Fig. 5D) showed a similar proliferation to VEGF alone. Also, in EA.hy926 cells, the  $\gamma$ -thionin combination does not affect cell proliferation in the presence of DMOG; however, the  $\gamma$ -thionin-VEGF combination lightly stimulated the proliferation (Fig. 5E). In addition, PaDef and PaDef-VEGF combination lightly increased the proliferation compared with DMOG treatment in EA.hy926 cells (Fig. 5F); however, this effect was insignificant. Altogether, these results indicate that peptides inhibit the VEGF pathway (Fig. 2) through a HIF-independent pathway.

### 3.6. PAPs interfere with forming tube structures induced by VEGF in EA.hy926 cells

The EA.hy926 cell line naturally forms tubular structures when exposed to a high protein matrix. We perform a tube formation assay using matrigel to analyze if PaDef or  $\gamma$ -thionin could interfere with this process. The results showed that the peptides do not interfere with the natural formation of tube structures (Fig. 6A and 6B) of EA.hy926 cells, but  $\gamma$ -thionin and PaDef reduced the tube structure induced by VEGF (Figs. 6A and 6B) at 8 h. The formation of tube structures was not observed in BUVECs (Fig. 6C).

### 3.7. PaDef and $\gamma$ -thionin could interact with VEGFR-2

According to the results, both peptides interfere with the VEGF stimulation in endothelial cells. We assessed the possible peptide interactions with the human VEGFR-2 receptor, VEGF, and the dimers VEGFR2/VEGFA, VEGFA/VEGFA, by molecular docking. The affinity energy determines the possible interaction between molecules. A negative value means a significant probability of interaction between molecules, whereas a positive value indicates the interaction is less likely. The docking assays showed that the interaction energy between VEGFR2 with PaDef or  $\gamma$ -thionin is more negative than reported. The affinity energies showed that the interaction energy between VEGFR2 with PaDef or  $\gamma$ -thionin is even more negative than the reported for VEGFA<sub>121</sub> and VEGFA<sub>165</sub> (isoforms of VEGF involved directly in the angiogenesis stimulation) (Table 1). The possible interaction site between PaDef or  $\gamma$ -thionin with VEGFR2 does not occur in the interaction site for VEGFA (Figs. 7A and 7B). Also, we performed the analysis considering the interaction between VEGFR2/VEGF, and the results showed that PaDef and  $\gamma$ -thionin could act near this site (Figs. 7C and 7D). We also analyzed a possible interaction between the peptides and VEGFA (monomer and dimer structure). The results showed a negative interaction energy (Table 1). PaDef and  $\gamma$ -thionin can interact with the

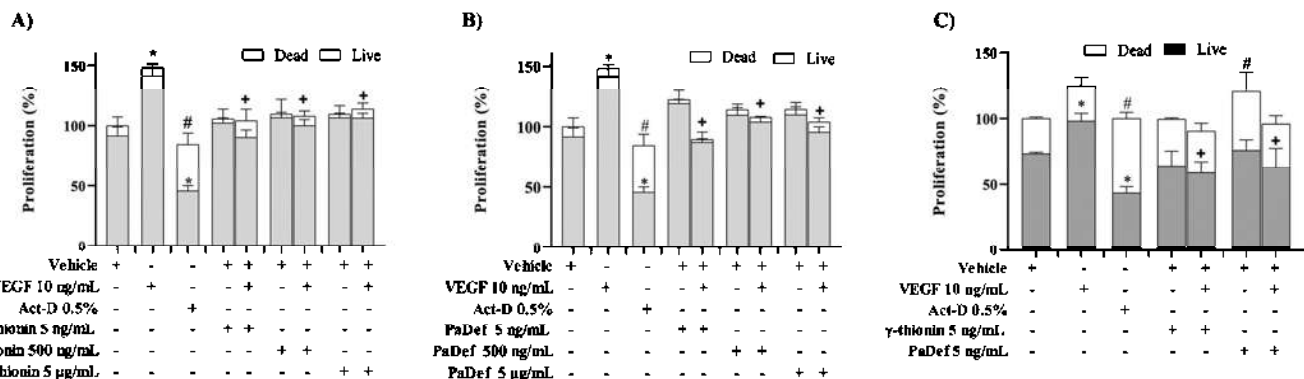
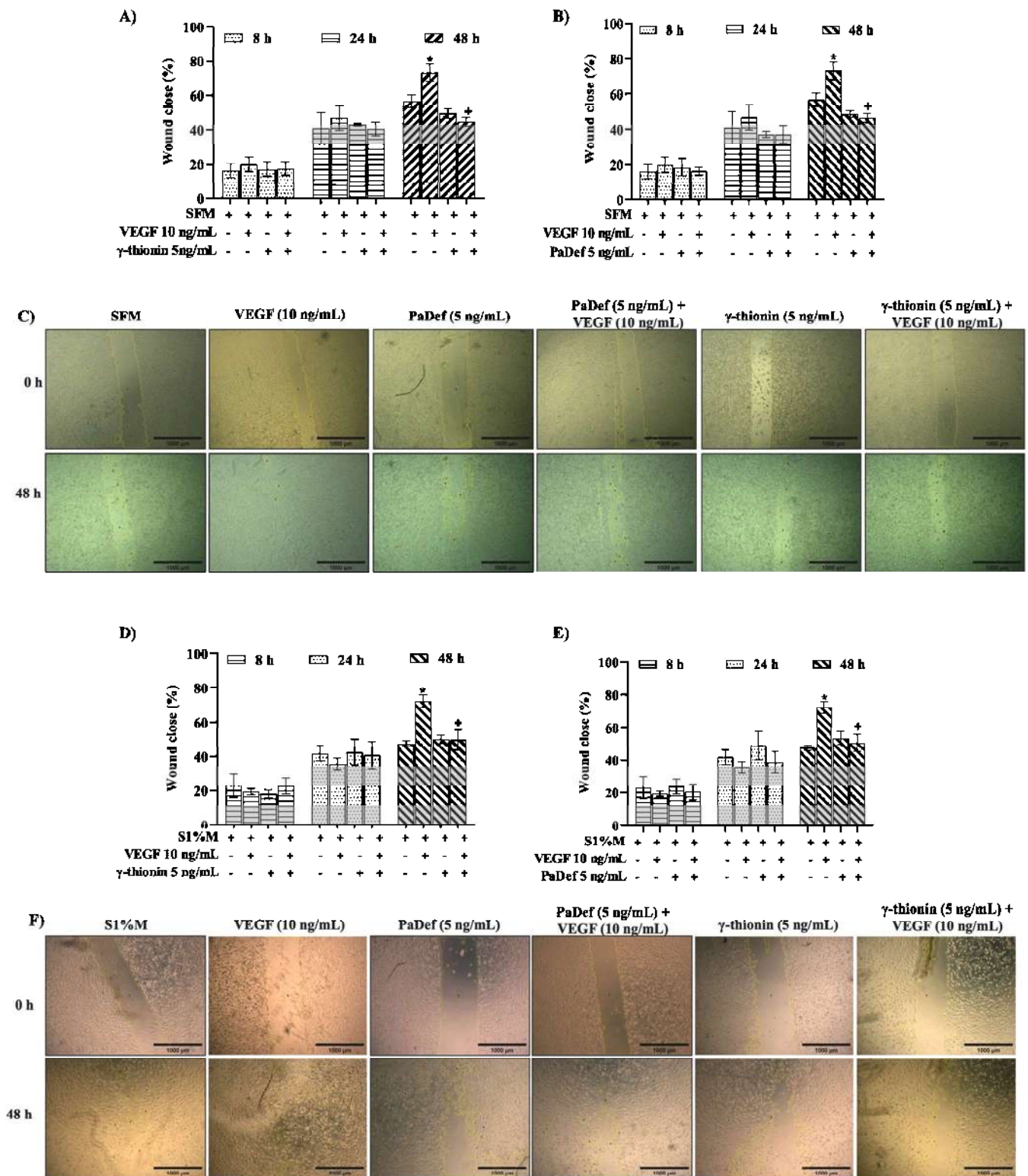
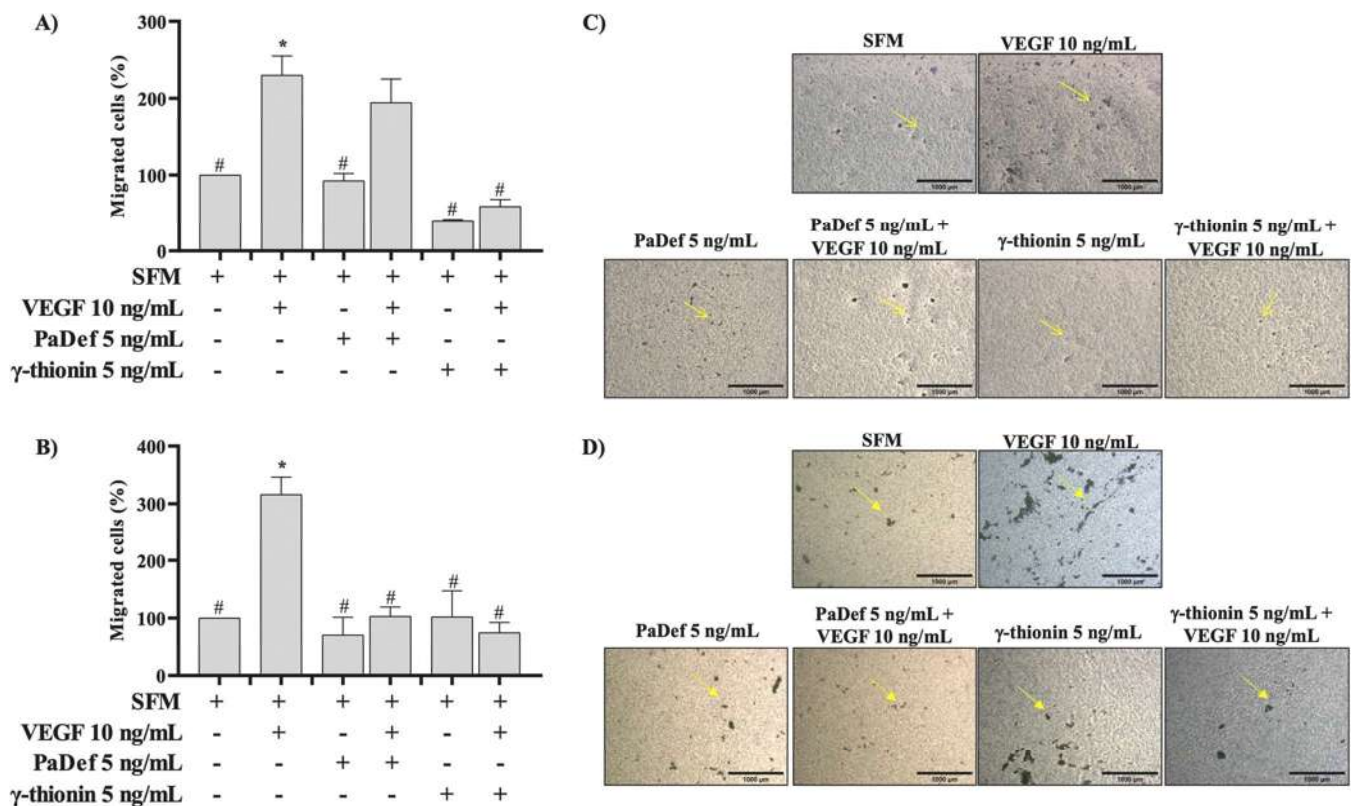


Fig. 2. Inhibitory effect of peptides  $\gamma$ -thionin and PaDef on VEGF stimulus. The combination of a peptide with VEGF (10 ng/mL) inhibited endothelial cell proliferation. (A) BUVEC treated with VEGF (10 ng/mL) and  $\gamma$ -thionin (5, 500 ng/mL or 5  $\mu$ g/mL) by 24 h; (B) BUVEC treated with VEGF (10 ng/mL) and PaDef (5, 500 ng/mL or 5  $\mu$ g/mL) by 24 h; (C) EA.hy926 cells treated with VEGF (10 ng/mL) and PaDef (5 ng/mL) or  $\gamma$ -thionin (5 ng/mL) by 24 h. Each bar shows the mean of triplicates  $\pm$  S.E. Data were analyzed by *t*-student. \* and # indicate a significant difference between the vehicle and live or dead cells, respectively ( $p < 0.05$ ). Vehicle: DMSO 0.4 %. + Indicates a significant difference between the treatment with the peptide+VEGF and the VEGF alone in live cells ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3. Peptides delay migration induced by VEGF on BUVEC and EA.hy926 cells.**  $\gamma$ -thionin (5 ng/mL) and PaDef (5 ng/mL) delay the migration caused by VEGF (10 ng/mL) in BUVEC cells (A and B, respectively) and EA.hy926 cells (D and E, respectively). Each bar shows the mean of triplicates  $\pm$  S.E. Data were analyzed by *t*-student. \* Indicates a significant difference concerning the respective control ( $p < 0.05$ ). + Indicates a significant difference between the treatment with the peptide + VEGF and the VEGF alone ( $p < 0.05$ ). SFM: Serum-free medium, S1%M: Medium with 1 % fetal bovine serum. (C) Representative images of BUVEC cell migration. (F) Representative pictures of EA.hy926 cell migration. The scale bar represents 1000  $\mu$ m.



**Fig. 4. Migration in transwell chamber.** (A) The number of migrated BUVEC cells per chamber after 24 h of induction. (B) The number of migrated EA.hy926 cells per chamber after 24 h of induction. The data were normalized to SFM. Each bar shows the mean of duplicates  $\pm$  S.E. Data were analyzed by *t*-student. \* and # indicate a significant difference concerning the SFM and VEGF, respectively ( $p < 0.05$ ). (C) Representative images of BUVEC cells migrated per chamber after 24 h of induction. (D) Representative pictures of EA.hy926 cells migrated per chamber after 24 h of induction. Arrows indicate migrated cells. SFM: Serum-free medium. The scale bar represents 1000  $\mu$ m.

same site at monomeric and dimeric VEGF molecules (Fig. 8).

#### 4. Discussion

Antimicrobial peptides (AMPs) are small molecules of the innate immune response in mammals, but all organisms also produce them. Besides their antimicrobial activity, AMPs have other activities, such as regulating the inflammatory response, wound repair, etc. [37]. Therefore, using peptides to treat some pathologies or stimulate cellular responses has been attractive [13]. However, the angiogenic effects of plant defensins on mammal cells have been poorly studied. This work evaluated the effect of a peptide from Mexican native avocado and a peptide from habanero chili pepper on angiogenesis-related events in bovine and human endothelial cells.

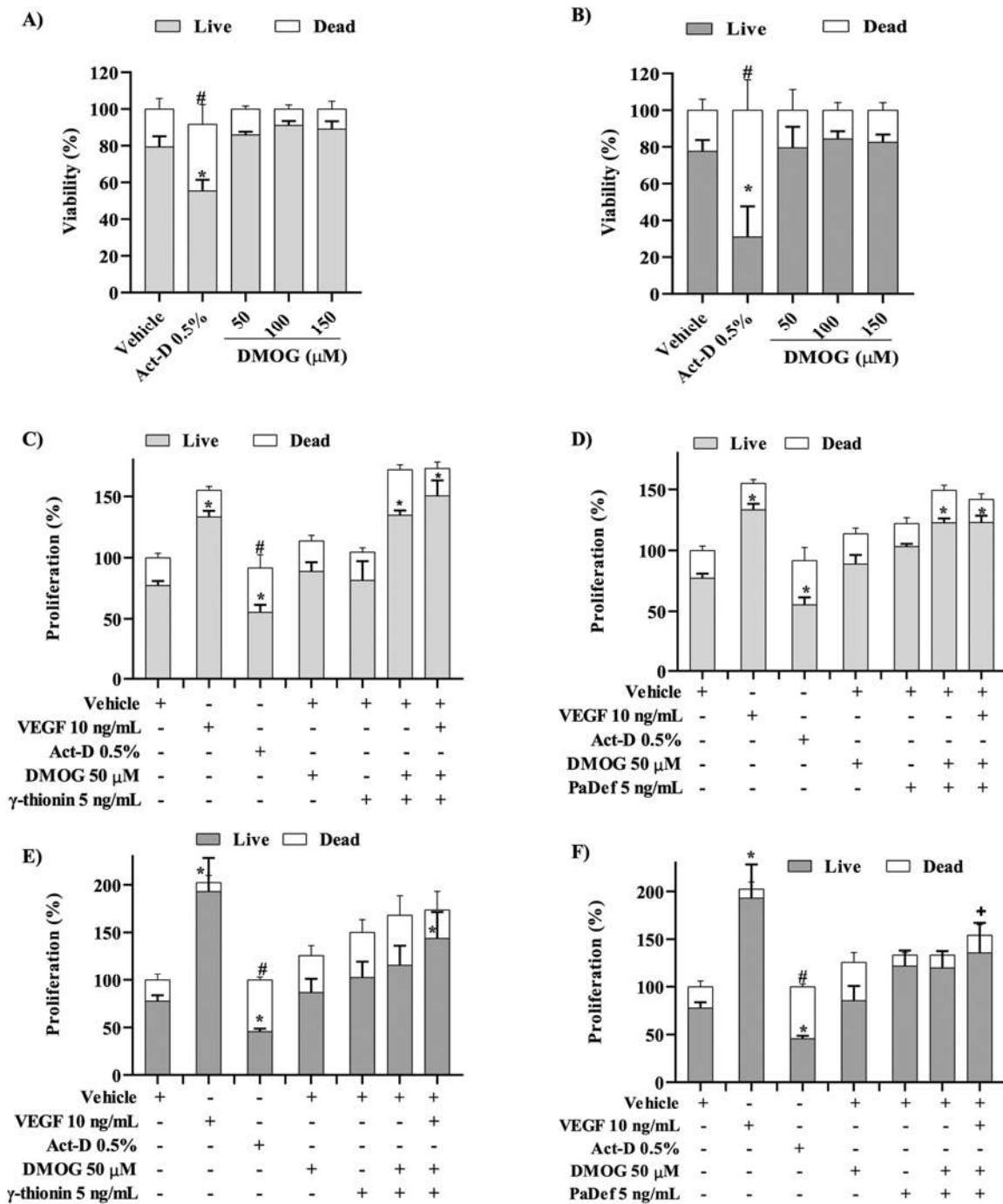
The endothelial cells must recognize a stimulus to initiate an inflammatory response or angiogenesis process. The VEGF is the primary stimulating molecule in endothelial cells due that favors migration and cellular proliferation, activates angiogenesis in hypoxic tissue, and is essential in maintaining tissues, wound healing, menstruation, and pregnancy [23]. First, we demonstrated that BUVEC responds to VEGF stimulus (Fig. 2), which agrees with a previous report [9]. Also, we used low concentrations of the peptides to avoid cytotoxic effects to evaluate if the defensins PaDef and  $\gamma$ -thionin regulate endothelial cell functions (Fig. 1). AMPs exert functions depending on the concentration; immunomodulatory functions, such as those related to inflammation, occur at low concentrations. The effects of the peptides analyzed in this work correspond to previous work that has reported immunomodulatory functions of plant defensins at low concentrations [10].

To determine if the peptides affect the VEGF stimulus, we evaluated the following scenarios: 1) Cells treated with peptide previous to the

stimuli with VEGF, 2) cells treated with VEGF and then with the peptide, and 3) VEGF and the peptide added to the cells at the same time. Interestingly, the addition of the peptides previously or at the same time that the VEGF produced the inhibition of the proliferative stimulus of VEGF in both endothelial cell lines. These results suggest that the peptides can probably interfere with the activity of VEGF. This inhibitory effect was not observed when the cells were treated with the VEGF and then with the peptide. PaDef or  $\gamma$ -thionin alone does not have an effect on proliferation on both cell lines, contrary to reported for some defensins; for example, human beta-defensin-2 (hBD-2) that stimulates the proliferation of human endothelial cells (HUVEC) in a VEGF independent way [4].

PaDef and  $\gamma$ -thionin were tested to determine if they affect cell migration, which is essential for angiogenesis and wound healing [34]. We observed that PaDef or  $\gamma$ -thionin at 5 ng/mL does not affect the migration process in bovine and human endothelial cells but inhibits the stimulatory effect of the VEGF at 24 h. This result differs from the synthetic peptide IDR101, which stimulates the migration of human endothelial cells by about 10 % at 24 h [21].

To explain if  $\gamma$ -thionin or PaDef inhibits the VEGF chemoattractant action by direct interaction with the molecule, we carried out a migration assay in transwell chambers. The results correlate partially with the wound healing assays because PaDef or  $\gamma$ -thionin does not affect the EA.hy926 cell migration. However,  $\gamma$ -thionin decreased about 60 % the migration of BUVEC. Also, the mix of VEGF and peptide decreased the migration compared to VEGF alone, which indicates that peptides do not have a chemotactic effect on endothelial cells and interfere with the chemotactic effect of VEGF. The genetic origin of the cells (EA.hy926 results from the fusion of A569 cells lung cancer with human endothelial cells) could explain the differential response in the number of migrated



**Fig. 5. Effect of chemical hypoxia on the peptide activity in endothelial cells.** Viability of (A) BUVEC and (B) EA.hy926 cells treated with DMOG 50, 100, or 150 μM at 24 h. \* and # indicate a significant difference in live and dead cells concerning the vehicle, respectively ( $p < 0.05$ ). The proliferation of BUVEC cells treated with γ-thionin (5 ng/mL) and VEGF (10 ng/mL) (C) or with PaDef (5 ng/mL) and VEGF (10 ng/mL) (D) in a chemical hypoxia environment is shown. The proliferation of EA.hy926 cells treated with γ-thionin (5 ng/mL) and VEGF (10 ng/mL) (E) or with PaDef (5 ng/mL) and VEGF (10 ng/mL) (F) in a chemical hypoxia environment is shown. Each bar shows the mean of triplicates ± S.E. Data were analyzed by *t*-student. \* and # indicate a significant difference in live and dead cells concerning the vehicle, respectively ( $p < 0.05$ ). + Indicates a significant difference between the treatment with the peptide + VEGF and the VEGF alone in live cells ( $p < 0.05$ ).

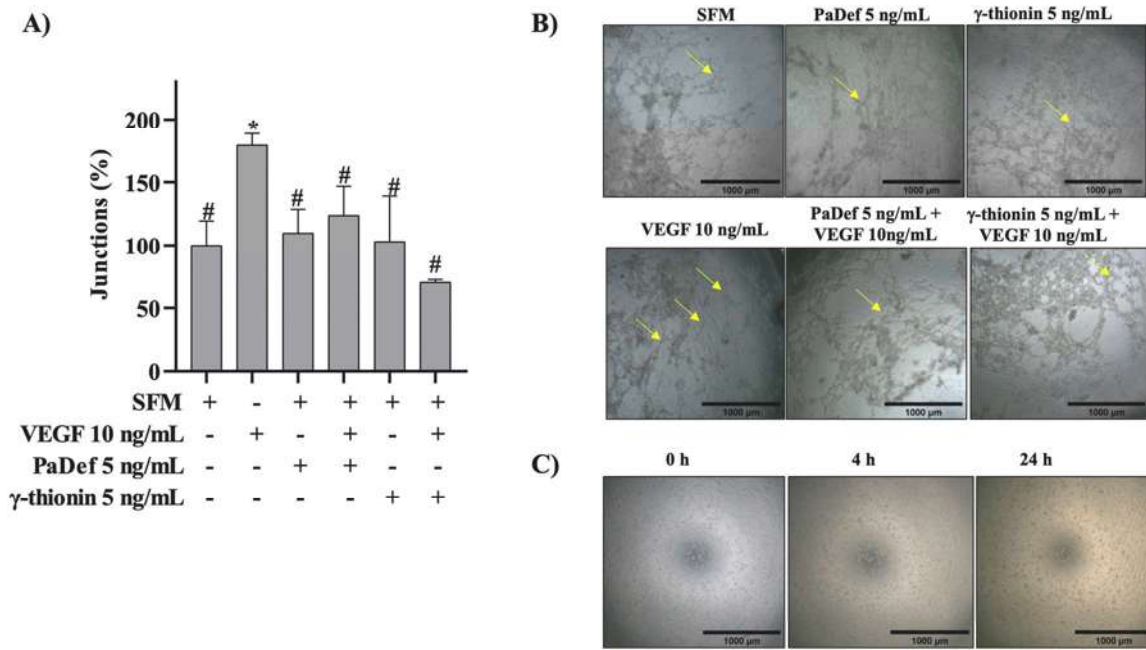
DMOG: Dimethyloxalylglycine, N-(Methoxyoxoacetyl)-glycine methyl. Vehicle: DMSO 0.4 %, Act-D: actinomycin.

cells [20].

In the same way, the peptides do not interfere with the tube formation process in the EA.hy926 cells. However, the peptides in combination with VEGF reduced the effect of the VEGF alone, suggesting that PaDef or γ-thionin acts on the VEGF pathway. Considering all the results, we proposed that the peptides could act directly on the VEGF molecule. However, the underlying mechanism is unknown, and other

experimental approaches are necessary.

An essential molecule in the angiogenesis process is the hypoxia-inducible factor (HIF)-1α, related to the VEGF activation in some hypoxia conditions. Therefore, we evaluate the influence of hypoxia in the interference of peptides with VEGF. Interestingly, the results indicate that the chemical hypoxia in cells treated with peptides does not affect the stimulating action of VEGF on the proliferation of BUVEC. This could



**Fig. 6.** Tube formation assay. (A) The number of joints formed between tubes after 8 h of treatment in EA.hy926 cells. Each bar shows the mean of two independent experiments performed in duplicates  $\pm$  S.E. Data were analyzed by *t*-student. \* and # indicate a significant difference concerning the control SFM and VEGF, respectively ( $p < 0.05$ ). + Indicates a significant difference between the treatment with the peptide+VEGF and the VEGF ( $p < 0.05$ ). SFM: Serum-free medium. (B) Cells EA.hy926 after 8 h of treatment seeding on matrigel. Representative images of 2 independent experiments. (C) Representative pictures of BUVEC treated with the complete medium at 0, 4, and 24 h of seeding on matrigel.

**Table 1**

Affinity energies obtained from molecular docking.

|                      | $\Delta G$ kcal/mol <sup>a</sup> |                     |
|----------------------|----------------------------------|---------------------|
| <b>VEGFR2</b>        |                                  |                     |
| VEGFA <sub>121</sub> | -8.9                             | (Brozzo et al. [8]) |
| VEGFA <sub>165</sub> | -8.6                             | (Brozzo et al. [8]) |
| PaDef                | -11.4                            | This work           |
| $\gamma$ -thionin    | -10.5                            | This work           |
| <b>VEGFR2/VEGF</b>   |                                  |                     |
| PaDef                | -13                              | This work           |
| $\gamma$ -thionin    | -13                              | This work           |
| <b>VEGFA/VEGFA</b>   |                                  |                     |
| PaDef                | -15.2                            | This work           |
| $\gamma$ -thionin    | -13.3                            | This work           |
| <b>VEGFA</b>         |                                  |                     |
| PaDef                | -12.3                            | This work           |
| $\gamma$ -thionin    | -11.9                            | This work           |

<sup>a</sup> The affinity energy determines the possible interaction between molecules.

be explained through the HIF-1 $\alpha$  mechanism, which involves the activation of VEGF, promoting the proliferation and migration of endothelial cells [26], or the activation of other peptides as angiotensin II, to stimulate the proliferative process in hypoxia environments. However, in EA.hy926 cells, the stimuli peptide-VEGF in the hypoxia environment shows that the peptides have a differential effect depending on the organism, although there is a tendency similar to BUVECs. Altogether, these results suggest that the peptides interfere with the VEGF pathway in a HIF-independent way.

The VEGF interacts with VEGFR2 to stimulate various processes related to angiogenesis, but the interaction between VEGF-VEGFR2 is just the initial part; the signaling process is different to carry out the proliferation, survival, migration, or vasodilatation of the endothelium [23]. Nevertheless, these results show that the peptides could interact directly with the VEGF molecule due to the observed general effects.

To explain a possible interaction between the peptides and the VEGF mechanism, we performed a docking assay. VEGF stimulates

angiogenesis through VEGFR2. Accordingly, we compared the affinity energy of the possible interaction between both peptides and this receptor. Interestingly the values were more negative ( $-11.4$  and  $-10.5$  kcal/mol) than the reported for VEGFA ( $-8.9$  kcal/mol) [7], which is the natural ligand. These results indicate the high possibility that the peptides can interfere with the interaction between VEGF and its receptor generating the inhibition of angiogenic functions. In addition, we investigated the possible interaction between VEGF with PaDef or  $\gamma$ -thionin; the interaction energy was very negative ( $-15.2$  and  $-13.3$  kcal/mol, respectively), suggesting a spontaneous interaction between the peptides and the VEGF.

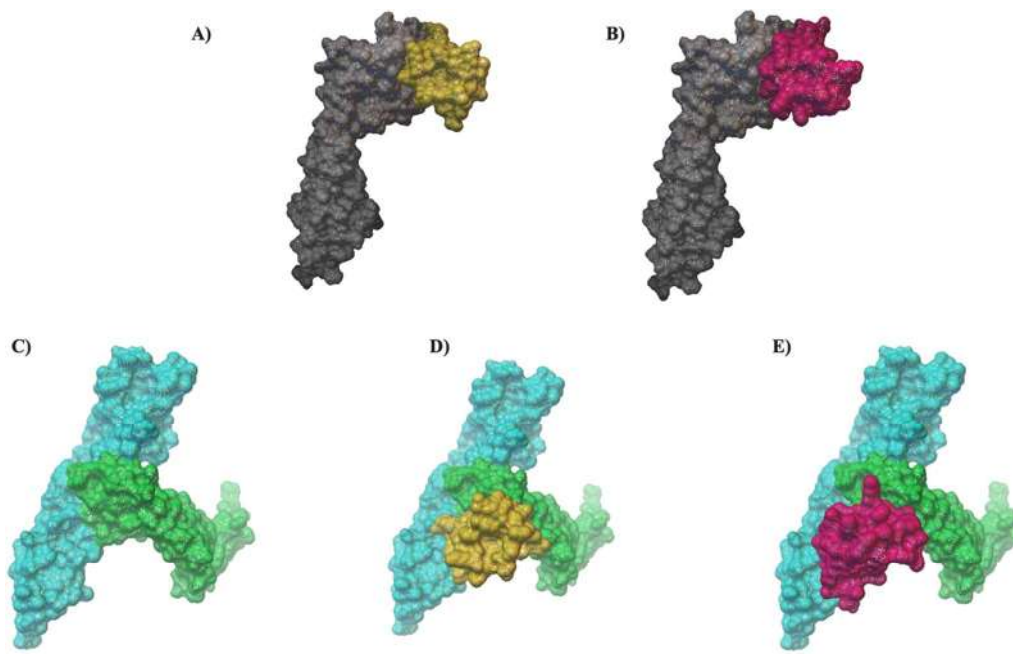
Interestingly, the peptides have a general effect over the VEGF stimulation on endothelial cells, which suggests that it is possible to use an exogenous peptide to generate an effect related to the angiogenesis process. Other works have shown that synthetic peptides derived from endogenous molecules could regulate angiogenesis by acting directly on VEGF stimulation [2], generating a beneficial stimulus in the deficient angiogenesis process. In this work, we demonstrate that peptides from plant origin can negatively regulate angiogenesis by inhibiting VEGF stimulation. We suggest that PaDef and  $\gamma$ -thionin could act through an independent VEGF-HIF1 $\alpha$  pathway, but future research is necessary to explore this issue.

## 5. Conclusion

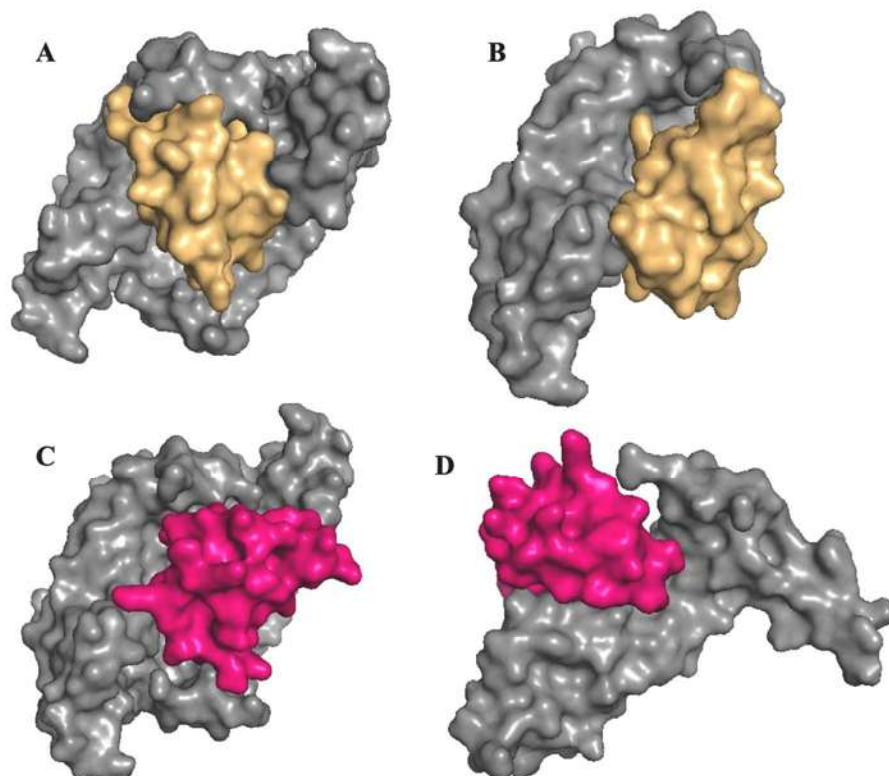
PaDef and  $\gamma$ -thionin at immunomodulatory concentrations interfere with the VEGF pathway, inhibiting processes related to angiogenesis in BUVEC and EA.hy926 endothelial cells, such as proliferation, migration, and tube formation.

## CRediT authorship contribution statement

EA F-R, J L-M, and A O-Z conceptualized and designed the experiments. EA F-R performed the experiments. EA F-R, J L-M, and A O-Z analyzed the data. EA F-R, J L-M, and A O-Z wrote the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.



**Fig. 7. Physical interaction between peptides and VEGFR2.** (A) PaDef (yellow) interacting with VEGFR2 (gray). (B)  $\gamma$ -thionin (pink) interacting with VEGFR2 (gray). (C) VEGFR2 (cyan) interacts with VEGFA (green). (D) VEGFR2 (cyan) interacts with VEGFA (green) and PaDef (yellow). (E) VEGFR2 (cyan) interacts with VEGFA (green) and  $\gamma$ -thionin (pink). The images of surfaces were visualized using the program PyMol.



**Fig. 8. Physical interaction between peptides and VEGFA.** (A) PaDef (yellow) interacting with the dimer VEGFA/VEGFA (gray). (B) PaDef (yellow) interacting with VEGFA (gray). (C)  $\gamma$ -thionin (pink) interacting with the dimer VEGFA/VEGFA (gray). (D)  $\gamma$ -thionin (pink) interacting with VEGFA (gray). The images were visualized using the program PyMol.

#### Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted without any commercial or financial relationships that could be construed as a

potential conflict of interest.

## Data Availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from CONACyT (C.B. 2016-287210) and CIC 14.1 from Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo to AOZ. EA F-R obtained a PhD Scholarship from CONACyT (743639).

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.peptides.2023.171008](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171008).

## References

- [1] A. Abbas, A. Lichtman, S. Pillai, Basic Immunology Abbas, 5th ed., 2016, <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [2] A. Adini, I. Adini, Z. long Chi, R. Derda, A.E. Birsner, B.D. Matthews, R.J. D'Amato, A novel strategy to enhance angiogenesis in vivo using the small VEGF-binding peptide PRIP, *Angiogenesis* 20 (2017) 399–408, <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9556-7>.
- [3] M. Báez-Magaña, N. Alva-Murillo, I. Medina-Estrada, M.T. Arceo-Martínez, J. E. López-Meza, A. Ochoa-Zarzosa, Plant defensin  $\gamma$ -thionin induces MAPKs and activates histone deacetylases in bovine mammary epithelial cells infected with *Staphylococcus aureus*, *Front. Vet. Sci.* 7 (2020) 1–10, <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00390>.
- [4] A. Baroni, G. Donnarumma, I. Paoletti, I. Longanesi-Cattani, K. Bifulco, M. A. Tufano, M.V. Carriero, Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells, *Peptides* 30 (2009) 267–272, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.11.001>.
- [5] T. Bian, H. Li, Q. Zhou, C. Ni, Y. Zhang, F. Yan, Human  $\beta$ -defensin 3 reduces TNF- $\alpha$ -induced inflammation and monocyte adhesion in human umbilical vein endothelial cells, *Mediat. Inflamm.* (2017), <https://doi.org/10.1155/2017/8529542>.
- [6] G.K. Bindra, S.A. Williams, F.T. Lay, A.A. Baxter, I.K.H. Poon, M.D. Hulett, T. K. Phan, Human  $\beta$ -defensin 2 (HBD-2) displays oncolytic activity but does not affect tumour cell migration, *Biomolecules* 12 (2022), <https://doi.org/10.3390/biom12020264>.
- [7] D. Kokai, B. Stanic, B. Tesic, D. Samard, K. Pogrmic-majkic, S. Fa, N. Andric, Dibutyl phthalate promotes angiogenesis in E.A. hy926 cells through estrogen receptor-dependent activation of pathways, *Chemo-Biol. Interact.* 366 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110174>.
- [8] M.S. Brozzo, S. Bjelić, K. Kisko, T. Schleier, V.M. Leppänen, K. Alitalo, F.K. Winkler, K. Ballmer-Hofer, Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization, *Blood* 119 (2012) 1781–1788, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390922>.
- [9] M. Cajero-Juárez, B. Avila, A. Ochoa, E. Garrido-Guerrero, A. Varela-Echavarría, G. Martínez de la Escalera, C. Clapp, Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium, *Eur. J. Cell Biol.* 81 (2002) 1–8, <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00213>.
- [10] V. Díaz-Murillo, I. Medina-Estrada, J.E. López-Meza, A. Ochoa-Zarzosa, Defensin  $\gamma$ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization, *Peptides* 78 (2016) 109–118, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.02.008>.
- [11] J. Folkman, Antiangiogenesis in cancer therapy – endostatin and its mechanisms of action, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 594–607, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.015>.
- [12] S. Frantz, K.A. Vincent, O. Feron, R.A. Kelly, Innate immunity and angiogenesis, *Circ. Res.* 96 (2005) 15–26, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000153188.68898.ac>.
- [13] L. Gran, F. Sandberg, K. Sletten, *Oldenlandia affinis* (R and S) DC: a plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine, *J. Ethnopharmacol.* 70 (2000) 197–203, [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00175-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00175-0).
- [14] A. Gurao, S.K. Kashyap, R. Singh,  $\beta$ -defensins: an innate defense for bovine mastitis, *Vet. World* 10 (2017) 990–998, <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.990-998>.
- [15] J.J. Guzmán-Rodríguez, R. López-Gómez, R. Salgado-Garciglia, A. Ochoa-Zarzosa, J.E. López-Meza, The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7, *Biomed. Pharmacother.* 82 (2016) 620–627, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.048>.
- [16] J.J. Guzmán-Rodríguez, A. Ochoa-Zarzosa, R. López-Gómez, J.E. López-Meza, Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents, *BioMed Res. Int.* (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/735087>.
- [17] P. Jiménez-Alcántar, R. López-Gómez, J.E. López-Meza, A. Ochoa-Zarzosa, PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*), a plant antimicrobial peptide, triggers apoptosis, and induces global epigenetic modifications on Histone 3 in an acute lymphoid leukemia cell line, *Front. Mol. Biosci.* 9 (2022) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.801816>.
- [18] H.I. Kawsar, S.K. Ghosh, S.A. Hirsch, H.B. Koon, A. Weinberg, G. Jin, Expression of human  $\beta$ -defensin-2 in intratumoral vascular endothelium and in endothelial cells induced by transforming growth factor  $\beta$ , *Peptides* 31 (2010) 195–201, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.12.008>.
- [19] A. Lennikov, P. Mirabelli, A. Mukwaya, M. Schapper, M. Thangavelu, M. Lachota, Z. Ali, L. Jensen, N. Lagali, Selective IKK2 inhibitor IMD0354 disrupts NF- $\kappa$ B signaling to suppress corneal inflammation and angiogenesis, *Angiogenesis* 21 (2018) 267–285, <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9594-9>.
- [20] Z.J. Lu, Y.Q. Ren, G.P. Wang, Q. Song, M. Li, S.S. Jiang, T. Ning, Y.S. Guan, J. L. Yang, F. Luo, Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 28 (2009) 1–10, <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-16>.
- [21] P. Marin-Luevano, V. Trujillo, A. Rodríguez-Carlos, I. González-Curiel, J.A. Enciso-Moreno, R.E.W. Hancock, B. Rivas-Santiago, Induction by innate defence regulator peptide 1018 of pro-angiogenic molecules and endothelial cell migration in a high glucose environment, *Peptides* 101 (2018) 135–144, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.01.010>.
- [22] A. Martin, M.R. Komada, D.C. Sane, Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus, *Med. Res. Rev.* 23 (2003) 117–145, <https://doi.org/10.1002/med.10024>.
- [23] C.S. Melincovici, A.B. Boşca, S. Şuşman, M. Mărginean, C. Mihu, M. Istrate, I. M. Moldovan, A.L. Roman, C.M. Mihu, Vascular endothelial growth factor (VEGF) – a key factor in normal and pathological angiogenesis, *Rom. J. Morphol. Embryol.* 59 (2018) 455–467.
- [24] A. Ochoa-Zarzosa, M. Báez-Magaña, J.J. Guzmán-Rodríguez, L.J. Flores-Alvarez, M. Lara-Márquez, B. Zavala-Guerrero, R. Salgado-Garciglia, R. López-Gómez, J. E. López-Meza, Bioactive molecules from native Mexican avocado fruit (*Persea americana* var. *drymifolia*): a review, *Plant Foods Hum. Nutr.* 76 (2021) 133–142, <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00887-7>.
- [25] S. Patan, Vasculogenesis, and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth, and remodeling, *J. Neurooncol.* 50 (2000) 1–15, <https://doi.org/10.1023/A:1006493130855>.
- [26] R. Ravi, B. Mookerjee, Z.M. Bhujwalla, C.H. Sutter, D. Artemov, Q. Zeng, L. E. Dillehay, A. Madan, G.L. Semenza, A. Bedi, Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , *Genes Dev.* 14 (2000) 34–44, <https://doi.org/10.1101/gad.14.1.34>.
- [27] Z. Wang, P. Liu, M. Hu, S. Lu, Z. Lyu, Y. Kou, Y. Sun, X. Zhao, F. Liu, J. Tian, Naioxintong restores ischemia injury and inhibits thrombosis via COX2-VEGF/NF- $\kappa$ B signaling, *J. Ethnopharmacol.* 270 (2021), 113809, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113809>.
- [28] J.J. Schneider, A. Unholzer, M. Schaller, M. Schäfer-Korting, H.C. Korting, Human defensins, *J. Mol. Med.* 83 (2005) 587–595, <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0657-1>.
- [29] H.U. Stotz, J.G. Thomson, Y. Wang, Plant defensins: defense, development and application, *Plant Signal. Behav.* 4 (2009) 1010–1012, <https://doi.org/10.4161/psb.4.11.9755>.
- [30] A. Szade, A. Grochot-Przeczek, U. Florczyk, A. Jozkowicz, J. Dulak, Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis, *IUBMB Life* 67 (2015) 145–159, <https://doi.org/10.1002/iub.1358>.
- [31] P. Torres, J. Díaz, M. Arce, P. Silva, P. Mendoza, P. Lois, A. Molina-Berrios, G. I. Owen, V. Palma, V.A. Torres, The salivary peptide histatin-1 promotes endothelial cell adhesion, migration, and angiogenesis, *FASEB J.* 31 (2017) 4946–4958, <https://doi.org/10.1096/fj.201700085R>.
- [32] O. Trott, A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.* 32 (2009) 174–182, <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [33] M.E. Velázquez-Hernández, A. Ochoa-Zarzosa, J.E. López-Meza, Defensin  $\gamma$ -thionin from *Capsicum chinense* improves butyrate cytotoxicity on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2, *Electron. J. Biotechnol.* 52 (2021) 76–84, <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.04.009>.
- [34] S. Werner, R. Grose, Regulation of wound healing by growth factors and cytokines, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 835–870, <https://doi.org/10.1152/physrev.2003.83.3.835>.
- [35] M. Zaiou, Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases, *J. Mol. Med.* 85 (2007) 317–329, <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0143-4>.
- [36] E. Guaní-Guerra, T. Santos-Mendoza, S.O. Lugo-Reyes, L.M. Terán, Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease, *Clin. Immunol.* 135 (2010) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.12.004>.
- [37] S. Patel, N. Akhtar, Antimicrobial peptides (AMPs): the quintessential 'offense and defense' molecules are more than antimicrobials, *Biomed. Pharmacother.* 95 (2017) 1276–1283, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.042>.
- [38] J.B. Guy, S. Espenel, A. Vallard, P. Battiston-Montagne, A.S. Wozny, D. Ardail, G. Alphonse, C. Rancoule, C. Rodriguez-Lafrasse, N. Magne, Evaluation of the cell invasion and migration process: a comparison of the video microscope-based scratch wound assay and the boyden chamber assay, *J. Vis. Exp.* (2017) 1–7, <https://doi.org/10.3791/56337>.

## **2. Capítulo II. Las defensinas de plantas PaDef y $\gamma$ -tionina inhiben la activación endotelial inducida por VEGF en células humanas EA.hy926**

### **The plant defensins PaDef and $\gamma$ -thionin inhibit VEGF-induced endothelial activation in EA.hy926 human cells**

Elba Andrea Falcón-Ruiz<sup>1</sup>, Alan Fabricio Cano Mendez, Martha Eva Viveros, Joel Edmundo López-Meza<sup>1</sup>, Alejandra Ochoa-Zarzosa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. Posta Veterinaria. C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

\*Corresponding author. Tel/Fax: 52+ 443 2958029

E-mail address: [alejandra.ochoa@umich.mx](mailto:alejandra.ochoa@umich.mx), [ochoaz@umich.mx](mailto:ochoaz@umich.mx) (A. Ochoa-Zarzosa)

Correspondence address: Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

## Resumen

La activación endotelial es un proceso altamente regulado que inicia mediante el reconocimiento de un estímulo inflamatorio. El estímulo activador induce la expresión de proteínas como VCAM, ICAM y algunas selectinas como E-selectina, sobre la superficie de las células endoteliales. Adicionalmente se genera un aumento en la producción de interleucinas y la activación de metaloproteasas. En este trabajo se evaluó la activación endotelial generada por dos defensinas provenientes de plantas (PaDef y  $\gamma$ -tionina) sobre la línea celular humana EA.hy926. Los resultados indican que ambos péptidos no afectan la adherencia de las células EA.hy926 a una matriz rica en proteínas. Por otro lado, PaDef aumentó 2 veces la expresión del gen *VEGFR7* y *E-selectina*; sin embargo,  $\gamma$ -tionina disminuyó 0.5 veces la expresión de los genes *VEGFA4* y *VEGFA7*. Adicionalmente las mezclas VEGF-péptidos aumentaron la secreción de la IL-8 e IL-6 comparada con el control, pero no afectaron la producción de especies reactivas de nitrógeno. Por otro lado, tanto PaDef como  $\gamma$ -tionina disminuyeron la adhesión de PMN al endotelio inducida por VEGF. Los resultados sugieren que los péptidos generan un estímulo activador del endotelio orientado al proceso inflamatorio y al estar en combinación con el VEGF inhiben la activación generada por el VEGF.

## **Abstract**

Endothelial activation is a highly regulated process that begins by recognizing an inflammatory stimulus. The activating stimulus favors the expression of VCAM, ICAM, and some selectins, such as E-selectin, on the surface of endothelial cells. Additionally, interleukin production and metalloprotease activation are generated. This work evaluated endothelial activation induced by two plant defensins: PaDef and  $\gamma$ -thionin, on the human cell line EA.hy926. The results indicate that both peptides do not affect the adherence of EA.hy926 cells to a rich-protein matrix; however, PaDef increased 2 times *VEGFR7* and *E-selectin* gene expression, but  $\gamma$ -thionin decreased 0.5 fold the *VEGFA4* and *VEGFA7* gene expression. Additionally, both peptides increased IL-8 and IL-6 secretion, compared to the control, but did not affect the reactive nitrogen species production. On the other hand, both PaDef and  $\gamma$ -thionin decreased PBMC adhesion to the endothelium induced by the VEGF. The results suggest that peptides stimulate the endothelium response to the inflammatory process, but the VEGF-peptides mix inhibits the endothelial activation of VEGF.

## **Introduction**

The vascular endothelium is the innermost part of the blood vessels; it consists of endothelial cells covered with an extracellular matrix and surrounded by a layer of stem cells or pericytes (Viallard & Larrivée, 2017). The vascular endothelium regulates vascular tone and fulfills essential barrier functions and nutrient and oxygen distribution. The endothelium has gained importance due to its properties related to the onset of the immune response, its association with inflammatory stimuli, and various pathologies such as tumor growth and rheumatoid arthritis (Carmeliet, 2000; Chang, 2022). Also, the endothelium is in contact with blood flow; it can interact directly with circulating cells in the bloodstream favoring a physiological response.

Endothelial activation favors the angiogenic process start (Barillari & Ensoli, 2002). However, the inflammatory response or angiogenesis depends on the initial stimulus. Endothelial activation can be induced by various molecules, such as histamine, LPS, growth factors, interferons, or interleukins (Pober, 2002). Upon detecting the activating stimulus, the endothelium expresses several molecules, such as E-selectin, and adhesion molecules on its surface that will benefit the immune cell's adhesion and migration to a particular site (Patan, 2000). Also, nitric oxide (NO) is produced by activation of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS), as well as vascular endothelium growth factor (VEGF), inflammatory interleukins (IL) (IL-1 $\beta$ , IL-6), anti-inflammatory (IL-10) and chemokines (IL-8) (Pober, 2002).

Endothelial activation is related to diverse physiological processes, such as angiogenesis and the inflammatory response. The correct regulation of both responses can be an important control point for some pathologies, such as tumor growth, which is characterized by a lack of angiogenesis regulation allowing a constant proinflammatory environment, which keeps the endothelium activated (Viallard & Larrivée, 2017).

There are several treatments to decrease the deregulated angiogenesis associated with tumors, which have as the main objective to inhibit VEGF activity (Folkman, 2006; Ramjiawan et al., 2017). Also, endothelial activation control has been proposed as an alternative to regulating the inflammatory and angiogenic process generated by VEGF stimulus (Melincovici et al., 2018).

Antimicrobial peptides have demonstrated an efficient strategy to regulate various processes, including angiogenesis and inflammation. However, little is known about using plant-based exogenous peptides for this purpose (Deslouches & Peter Di, 2017). Previously, we have reported 2 defensin-type peptides from plants, PaDef and  $\gamma$ -thionin, that interfered with VEGF stimulus avoiding its angiogenic activity (Falcón-Ruiz et al., 2023). However, the effects of these peptides on endothelial activation are unknown, which was the objective of this work.

## Materials and methods

### *Peptides*

The mature region of peptides used in this work was chemically synthesized and obtained from BIOMATIK. PaDef (ATCETPSKHFNGLCIRSSNCASVCHGEHFTDGRRCQGVRRRCMCLKPC, 47 aa, Genbank KC007441) (Guzmán-Rodríguez et al., 2016), a defensin from *Persea americana* var. *drymifolia*; and  $\gamma$ -thionin (QNNICKTTSKHFKGLCFADSKCRKVCIQEDKFEDGHCSKLQRKCLCTKNC, 50 aa, Genbank AF128239), a defensin from *Capsicum chinense* were the peptides employed. The peptides (962  $\mu$ M) were resuspended in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) and then air oxidized for five days at room temperature for disulfide bond formation (Guzmán-Rodríguez et al., 2015). The peptide concentration range used in this study was 5 ng/mL-5  $\mu$ g/mL. The final concentration of vehicle (DMSO) for all the experiments was 0.4%, which was used as a control.

### *Cell cultures*

The human endothelial cell line EA.hy926 (cell line established by primary fusion of human umbilical cord cells with clone A549) (kindly donated by Dr. Bruno Rivas-Santiago from Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Biomédica Zacatecas, Zacatecas, México) was used in this work. The cells were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM high glucose, Sigma), supplemented with 10% FBS (Biowest), 100 U/mL penicillin, and streptomycin (Gibco), sodium pyruvate 1 mM, and endothelial growth supplement from bovine pituitary (3 mg/mL) (Sigma). The cells were grown in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

### *Expression analysis of activation response genes*

We used EA.hy926 monolayers ( $\sim 2 \times 10^5$  cells cultured in 24-well dishes) incubated with VEGF (10 ng/mL), peptides 5 ng/mL (PaDef or  $\gamma$ -thionin) or VEGF-peptide mix for 24 h. EA.hy926 total RNA (5  $\mu$ g) was extracted from all conditions with Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and was used to synthesize cDNA as described. The actin gene was used as the internal control. The primers (Invitrogen) and PCR conditions used to amplify the human genes (VEGF4, VEGF7, eNOS, E-selectin) are described in Table 1. Gene expression analysis was performed by qPCR using the comparative Ct method ( $\Delta\Delta$ Ct) and the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in a StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

**Table 1. Primers used in the RT-qPCR analysis**

| Gene              | Sequence (5'→3')   | Tm (° C) | Fragment (bp) | Reference           |
|-------------------|--|----------|---------------|---------------------|
| <b>E-selectin</b> | F- GTCCGCCAGCCCTCAGAATG<br>R- TCGCTCGGGGTTGGACA            | 57       | 208           | Kokai et al., 2020  |
| <b>eNOS</b>       | F- GACCCTCACCGCTACAACAT<br>R-CTGGCCTTCTGCTCATTTTC          | 56       | 209           | This work           |
| <b>VEGFA4</b>     | F-GCAGCTTGAGTTAAACGAACG<br>R-GGTTCCCGAAACCCTGAG            | 60.5     | 80            | Marin-Luevano, 2018 |
| <b>VEFA7</b>      | F- GAGTTAAACGAACGTA CTTCGAGA<br>R- TCAGGTTTCTGGATTAAGGACTG | 60.5     | 100           | Marin-Luevano, 2018 |
| <b>Actin</b>      | F- AAAACCTAACTTGCGCAGAAAACA<br>R- TGTCACCTTCACCGTTCCACTTT  | 57       | 317           | This work           |

#### *Cytokines and activation molecules production*

Interleukin and activation molecules secretion levels were assessed by flow cytometry. EA.hy926 cells were treated with VEGF 10 ng/mL,  $\gamma$ -thionin (5 ng/mL), PaDef (5 ng/mL), or VEGF-peptide mix for 24 h. According to the manufacturer's protocol, IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, and TNF- $\alpha$  were quantitatively determined in supernatants using a Flex Set Cytometric Bead (CBA, Becton Dickinson). The samples were analyzed using a BD Accuri™ C6 flow cytometry and CBA analysis FCAP software (Becton Dickinson). Three thousand events (beads) were acquired following the supplied protocol (<https://www.bdbiosciences.com>). The minimum detection levels for each protein were 20 pg/mL. The FCAP Array software enables

complete data file analysis and extrapolating sample values (supernatants) by comparison against a standard curve for each protein.

Endothelial activation was assessed using the LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay Kit (Cat. No. 740891, human thrombosis panel). EA.hy926 cells were treated with VEGF 10 ng/mL,  $\gamma$ -thionin (5 ng/mL), PaDef (5 ng/mL), VEGF-peptide mix, or LPS (100 ng/mL) for 24 h. The sCD40L, P-Selectin, and PSGL-1 molecules were quantitatively determined in supernatants. The minimum detection levels for each protein were 10 pg/mL. The BioLegend's LEGENDplex™ software enables complete data file analysis and extrapolating sample values (supernatants) by comparison against a standard curve for each protein.

#### *Matrigel adhesion*

A matrigel adhesion assay was performed to evaluate whether the peptides regulate the adhesion of endothelial cells to the extracellular matrix (a critical process in activation to induce angiogenesis). The EA.hy926 cells ( $5 \times 10^4$ ) were re-suspended in 100  $\mu$ L of the medium, and the treatments were added [VEGF (10 ng/mL),  $\gamma$ -thionin (5 ng/mL), PaDef (5 ng/mL) or VEGF-Peptide mix]. Further, cells were seeded over 50  $\mu$ L of matrigel (previously polymerized) in 96-well plates. The cells were incubated for 1 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After incubation, the supernatant was removed (to eliminate the cells not adhering). Subsequently, 50  $\mu$ L of MTT was added and kept in darkness in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 4 h. At the end of the incubation, the supernatant was removed, and the crystals were dissolved with isopropanol: HCl. Optical density was measured at 545 nm.

#### *Nitric oxide production*

The nitric oxide (NO) secreted by EA.hy926 cells into the culture medium was evaluated by measuring the nitrite concentration (NO<sup>2-</sup>) in the supernatants of cells

treated with VEGF 10 ng/mL,  $\gamma$ -thionin (5 ng/mL), PaDef (5 ng/mL) or VEGF-peptide mix, using the Griess reaction (Jay, 1979).

#### *PBMC adhesion to endothelial cells by cytometry*

A cell-cell adhesion test was conducted to determine whether the peptides stimulate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) adhesion to activated endothelial cells. Peripheral blood cells were isolated from healthy donors by Ficoll gradient. Cells were stained with Calcein-AM 2  $\mu$ M for 30 min and washed twice with PBS. In parallel,  $100 \times 10^3$  EA.hy926 cells were seeded in 48-well plates and treated for 24 h with VEGF (10 ng/mL),  $\gamma$ -thionin (5 ng/mL), PaDef (5 ng/mL) or VEGF-peptide mix. LPS (100 ng/mL) was used as an activation control. After treatments, the supernatants were removed, and the cells were washed two times with PBS. Further,  $25 \times 10^3$  lymphocytes were added (previously dyed with Calcein-AM resuspended in DMEM medium) for 1 h. Then, the supernatants were discarded to remove non-adhered cells. Finally, cells were washed with PBS and trypsin-collected. Cells were maintained on ice until reading on the cytometer. The cell populations were selected using stained and undyed lymphocyte samples based on the FSC-H and SCA-H parameters. The frequency of stained cells was used to determine the adhered PBMCs to the endothelial cells.

#### *Apoptosis assessment*

Assays were performed with  $20 \times 10^3$  cells/well in 48-well plates. Cells were synchronized and treated. After 24 h of treatment, cells were collected and stained according to the manufacturer's instructions (annexin V, Alexa Fluor 488 conjugate, Invitrogen). The apoptosis rate was determined using annexin V and 7AAD in a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo v10.4 software (TreeStar, Inc.). Actinomycin D (0.5  $\mu$ M) was used as a positive control for apoptosis.

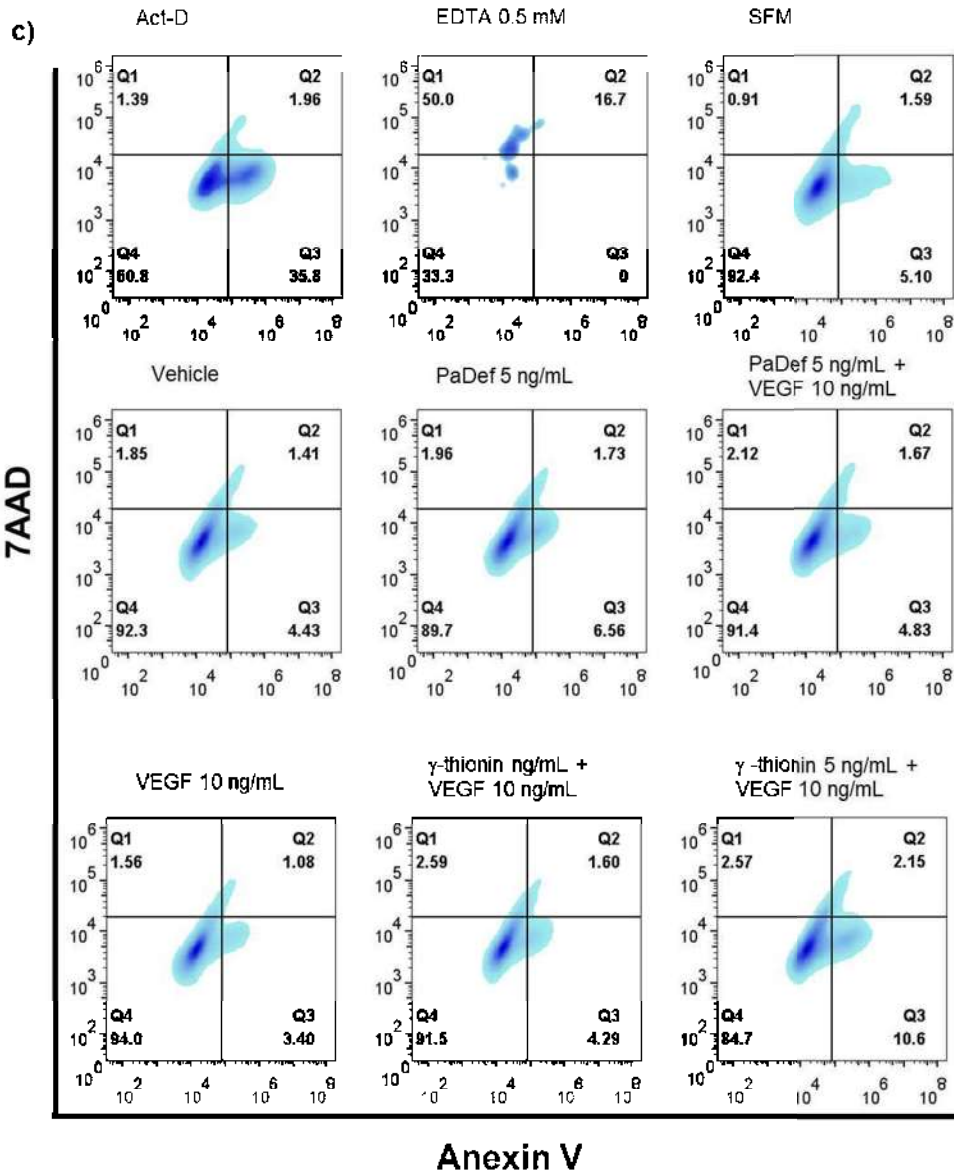
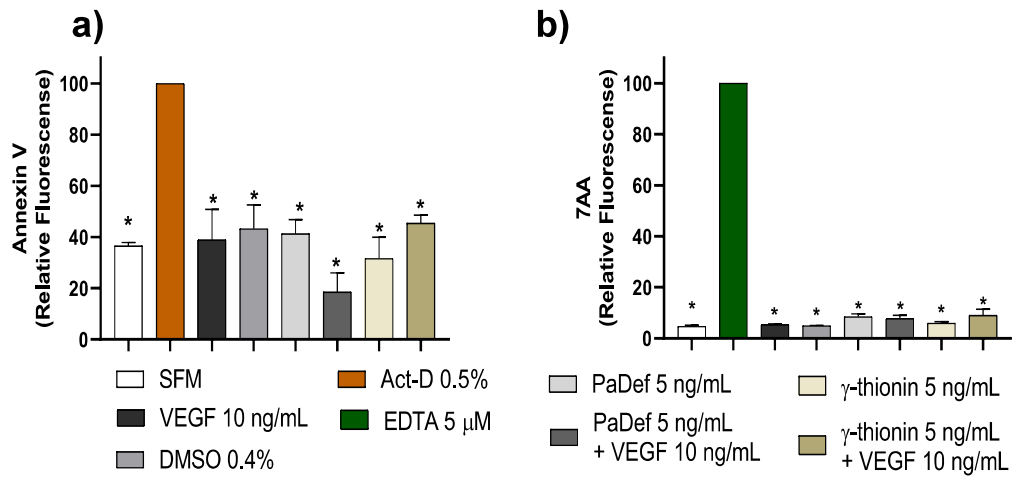
### *Data analysis*

The data were analyzed with PRISM 8.0.2 software by performing a *t-student* analysis. The results are reported as the mean  $\pm$  the standard error (S.E.), and the significance level was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### *PaDef and $\gamma$ -thionin don't modify the apoptosis rate of EA.hy926 cells*

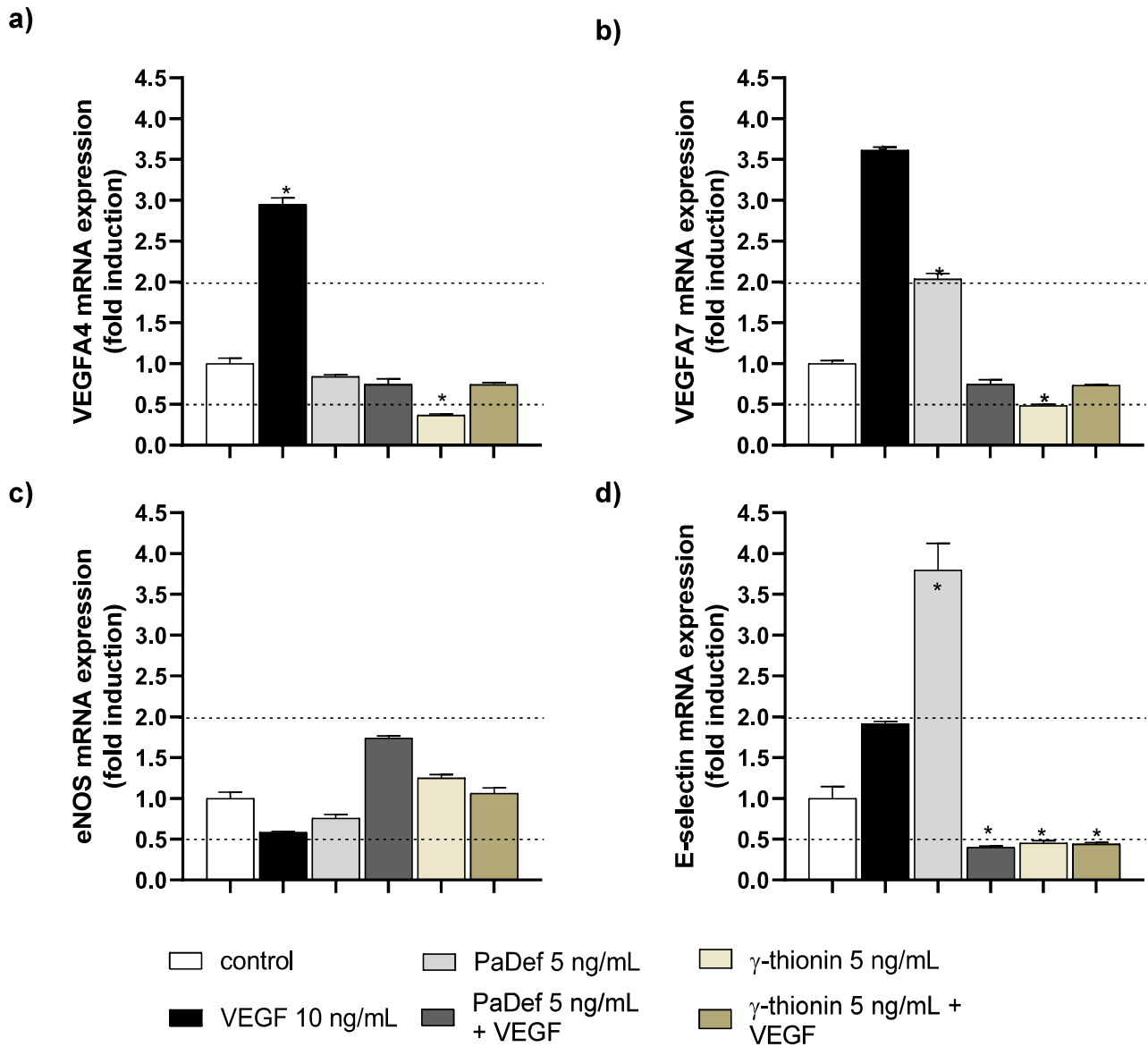
PaDef and  $\gamma$ -thionin induced death in cancer cells mainly through apoptosis (Flores-Alvarez et al., 2023; Jiménez-Alcántar et al., 2022). For this reason, we evaluate if the concentration of peptide used in this work activates apoptosis in EA.hy926 cells. Results showed that both peptides do not affect the apoptosis rate or necrosis (Figure 1). These results demonstrate that both peptides are not cytotoxic at the used concentration.



**Figure 1. EA.hy926 cells apoptosis assessment.** The graph shows the relative fluorescence units of **(a)** annexin V and **(b)** 7AAD for each condition. Each bar shows the mean of triplicates  $\pm$  SE of two independent experiments. **(c)** Representative flow cytometry plots of the different treatments are shown. Annexin V / 7AAD staining was used to establish the apoptotic rate. Quadrants indicate viable cells (lower left quadrant), early apoptosis (lower right quadrant), late apoptosis (upper right quadrant), and necrotic cells (upper left quadrant). \* Significant difference concerning control (Act-D or EDTA). SFM: Serum-free medium.

*PaDef increases the antiangiogenic gene expression, and  $\gamma$ -thionin decreases angiogenic gene expression*

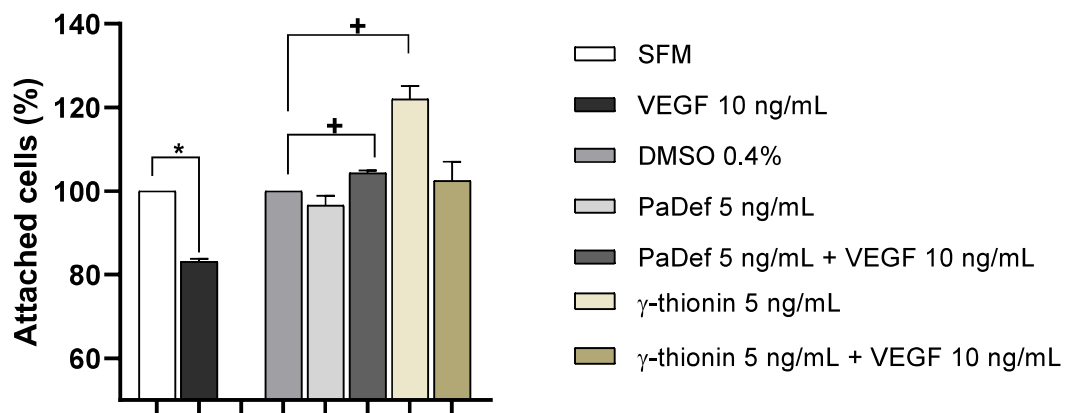
The effect of the peptides on the expression of genes related to endothelial activation was assessed analyzed the expression of two VEGFA variant genes: *VEGFA4* (proangiogenic) and *VEGFA7* (antiangiogenic). Also, two genes involved in the sustained activation of the endothelium were evaluated: *E-selectin* and *eNOS*. The results showed an up-regulation of the *VEGFA7* (2-fold) and *E-selectin* (4-fold) genes (Figure 2b, d) by PaDef. Interestingly,  $\gamma$ -thionin decreased the expression of both genes by 0.5-fold (Figure 2b, d), but the combinations VEGF-PaDef and VEGF- $\gamma$ -thionin only reduced the *E-selectin* expression (0.5-fold). Also, as expected, the VEGF treatment up-regulated the angiogenic genes *VEGFA4* (3-fold) and *VEGFA7* (3.5-fold) (Figure 2a, b) but didn't modify *eNOS* and *E-selectin* (Figure 2c, d). These results suggest that  $\gamma$ -thionin and VEGF-peptides mix down-regulate the angiogenic response and PaDef increases antiangiogenic genes.



**Figure 2. Expression of endothelial activation genes.** RT-qPCR analysis showing the mRNA expression levels of **a) VEGFA4**, **b) VEGFA7** **c) eNOS** and **d) E-selectin**. The data are presented as the ratio of the target gene expression compared with the expression level of Actin. Each bar shows the mean of triplicates  $\pm$  SE of two independent experiments. Fold-change values greater than 2 or less than 0.5 were considered significant differentially expressed mRNAs. \* Indicates a significant decrease concerning control, # indicates a significant increase concerning control.

*γ*-thionin and the VEGF-PaDef mix increase EA.hy926 cell adhesion to matrigel

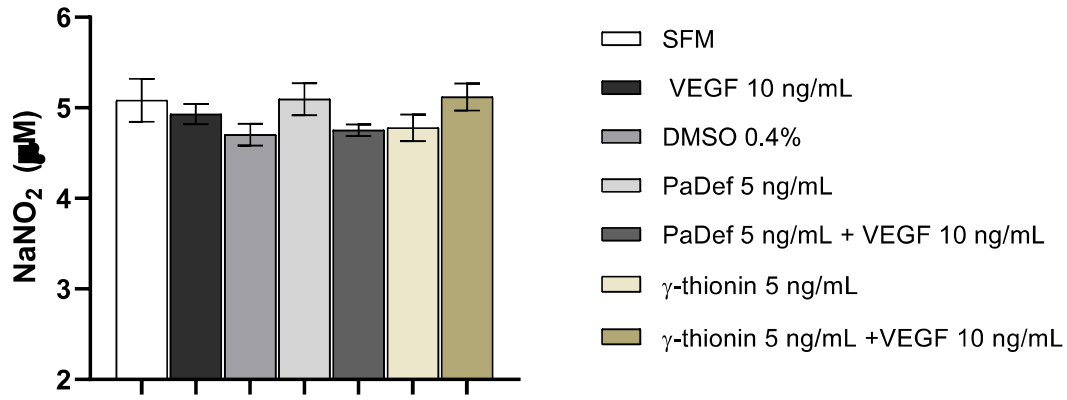
Activation of endothelial cells favors detaching the cells from the extracellular matrix (pro-angiogenic process); contrary, if an anti-angiogenesis process is triggered, endothelial cell adhesion to the matrix is strengthened. The matrigel adhesion test was performed to determine whether peptides affect cell adhesion to a matrix. The results indicated that VEGF decreased cellular adhesion to matrigel by 20% and  $\gamma$ -thionin increased adhesion by 25% concerning the vehicle, but the mix VEGF- $\gamma$ -thionin was similar to the vehicle (Figure 3). Also, PaDef does not affect cell adhesion, but the VEGF-PaDef mixture slightly increased adhesion by 4%. These results showed a differential response induced by the peptides because the VEGF-peptide mixes had an opposite effect than VEGF alone.



**Figure 3. EA.hy926 cell adhesion to matrigel regulated by PAPs.** The cells were resuspended on SFM supplemented with PaDef,  $\gamma$ -thionin or VEGF-peptide mix and seeded on Matrigel and incubated for 1 h to determine the adhesion activity. The obtained results of cells treated with VEGF was normalized respect to SFM. The obtained results of cells treated with peptides and VEGF-peptide mix was normalized respect to DMSO. Mean  $\pm$  SEM, *t student*, \* Significant difference concerning SFM. + significant difference concerning Vehicle (DMSO). SFM: Serum-free medium.

### *PaDef and $\gamma$ -thionin don't affect nitrite production in EA.hy926 cells*

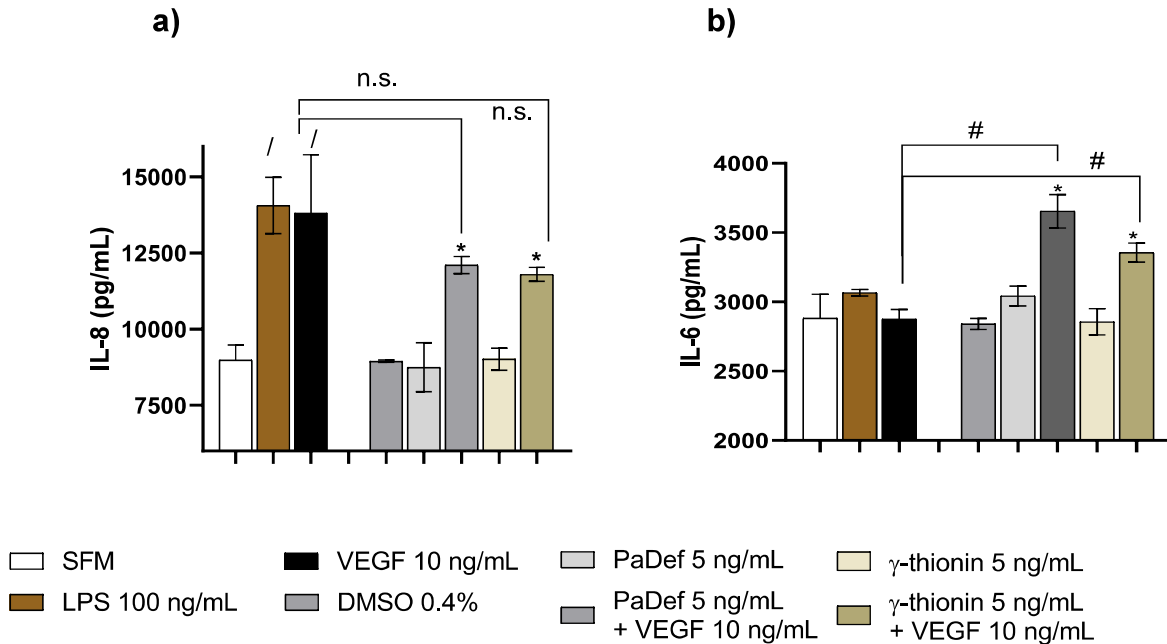
The results indicate that the peptides, only or combined with VEGF, do not affect the nitrite production concerning the control (Figure 4).



**Figure 4. Nitric oxide production in EA.hy926 cells.** The supernatants were analyzed using the Griess reaction. n=6, Mean of 2 independent experiments  $\pm$  SEM. SFM: Serum-free medium.

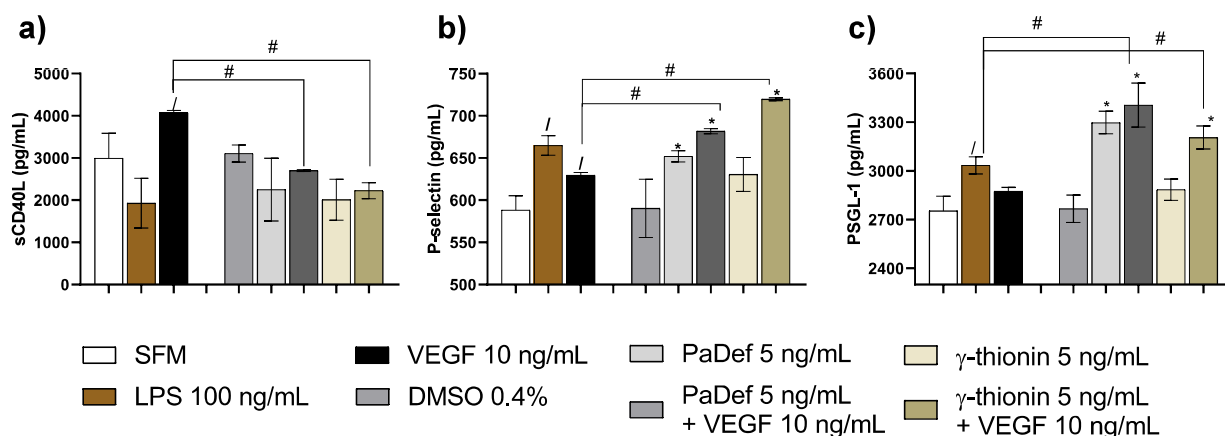
### *VEGF-peptides mix increases IL-6, IL8 and activation molecules production in EA.hy926 cells*

The cytokines and selectins are essential to endothelial activation. Accordingly, we evaluated the IL-6 and IL-8 secretion. The results showed that VEGF, VEGF-PaDef, and VEGF- $\gamma$ -thionin treatments increased IL-8 secretion, but the peptides alone didn't modify it (Figure 5a). Also, the IL-6 secretion only increased when cells were exposed to VEGF-peptide treatments (Figure 5b). However, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , and IL-10 were not detected. These results suggest that VEGF-peptide treatments favor an inflammatory process but not angiogenesis stimulation.



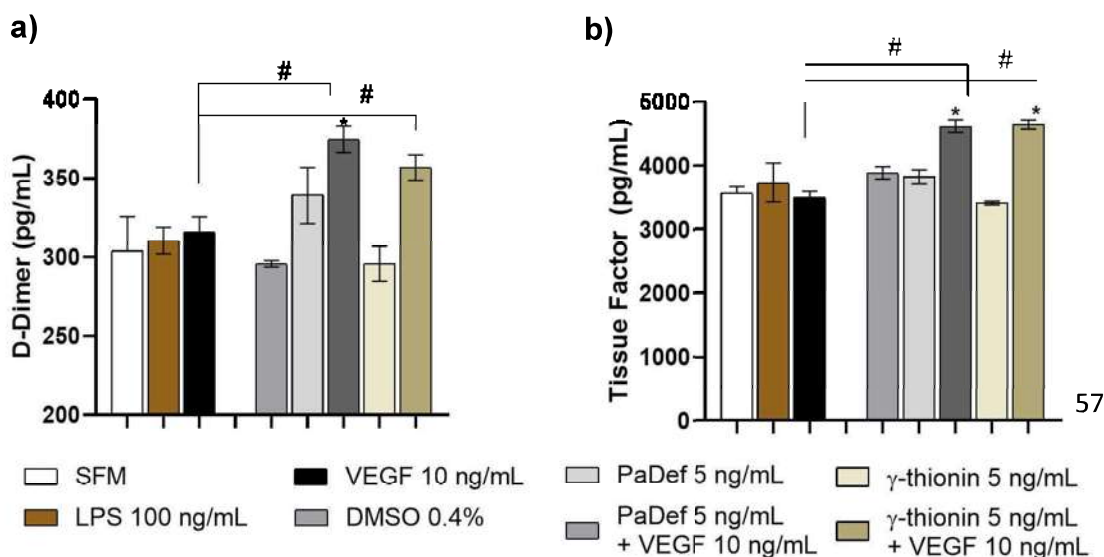
**Figure 5. Cytokine secretion regulated by PAPs in EA.hy926 cells.** The supernatants of cells were used to measure **a) IL-8** and **b) IL-6** secretion after 24 h of treatment. Mean  $6 \pm$  SEM. *t*-student. / Indicates significant differences concerning SFM. \* Indicates significant differences concerning the vehicle. # Indicates significant differences concerning VEGF. SFM: Serum-free medium.

On the other hand, VEGF increased the secretion of sCD40L and P-selectin but did not increase PSGL-1 (Figure 6). PaDef treatment greatly stimulates the P-selectin and PSGL-1 secretion (Figure 6b, c) but doesn't increase sCD40L. Interestingly,  $\gamma$ -thionin does not affect the P-Selectin, PSGL-1, and sCD40L secretion (Figure 6). Also, VEGF-PaDef and VEGF- $\gamma$ -thionin treatment increased the secretion of P-selectin and PSGL-1 but did not increase sCD40L. These results indicate that the peptides keep the activation process even during VEGF interaction. Still, the absence of sCD40L in the supernatants of VEGF-peptides treatments shows that the activation generated by the peptides is not related to angiogenesis and is directed to increase the inflammatory response.



**Figure 6. Endothelial activation molecules secreted regulated by PAPs in EA.hy926 cells.** The supernatants of EA.hy926 cells were used to measure **a)** sCD40L, **b)** P-selectin, and **c)** PSGL-1 after 24 h of treatment. n=6, Mean  $\pm$  SEM. *t*-student. / Indicates significant differences concerning SFM, \* Indicates significant differences concerning the vehicle, # Indicates significant differences concerning VEGF. SFM: Serum-free medium.

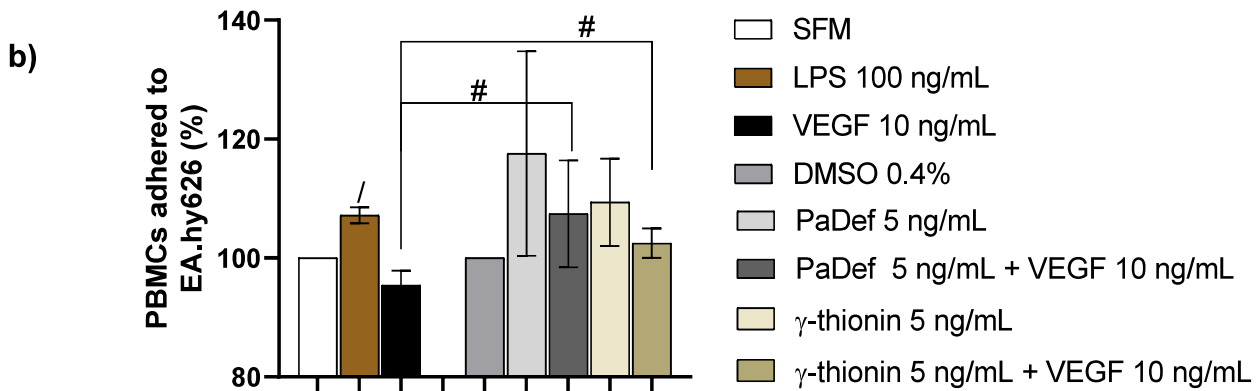
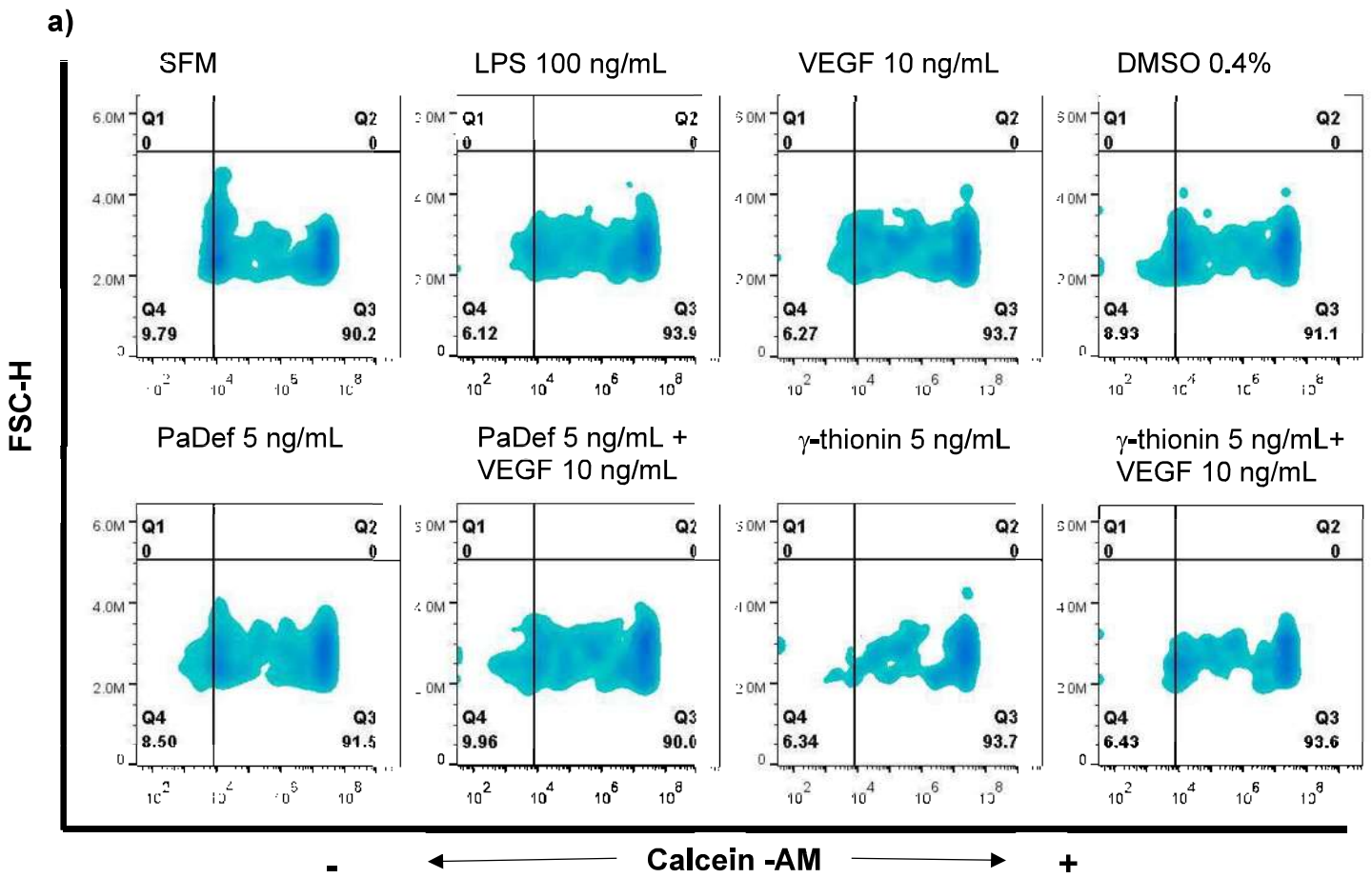
The coagulation activation factors (tPA, PAI-1, D-dimer, and tissue factor) were also evaluated. These factors also be related to the endothelial activation in response to the inflammatory stimulus. The results showed that VEGF-PaDef and VEGF- $\gamma$ -thionin increased the secretion of D-dimer and tissue factor concerning VEGF (Figure 7c, d), but the peptides alone do not modify it. The PAI-1 and tPA secretion doesn't present significant changes (data not shown).



**Figure 7. Coagulation factors secretion regulated by PAPs in EA.hy926 cells.** The molecules were detected in the supernatants of EA.hy96 cells after 24 h of treatment. **a)** D-dimer, **b)** Tissue factor. n= 6, Mean  $\pm$  SEM. t-student. / Indicates significant differences concerning SFM. \* Indicates significant differences concerning the vehicle. # Indicates significant differences concerning the VEGF. SFM: Serum-free medium.

#### *Peptides increase the PBMC adhesion to EA.hy926 cells*

An essential process of endothelial activation is the attraction and adhesion of immune cells. Using an adhesion assay, we explored whether the peptides could regulate the interaction between PBMCs and the endothelium. The results showed that PaDef, VEGF-PaDef, and  $\gamma$ -thionin treatments stimulated the PBMC adhesion to the endothelium similar to LPS (positive control) (Figure 8b). Interestingly, the peptide stimulation was 20% higher than the VEGF alone, which suggests that peptides are involved in the inflammatory response.



**Figure 8. PBMC adhesion to the EA.hy926 cells regulated by PAPs.** a) Representative images of two independent experiments. The plots show the amount of PBMC (stained with Calcein-AM) adhered to EA.hy926 monolayer. b) Data graph of the detected cells by the cytometer. LPS was used as a positive activation control, and SFM was used as a negative control. *t-Student*. Mean  $4 \pm$  SEM. / Indicates significant differences concerning the SFM. # Indicates significant differences concerning VEGF. SFM: Serum-free medium.

## Discussion

Endothelial activation is a complex mechanism that results in different processes, such as inflammation and angiogenesis. It can be initiated by growth factors recognized by GPCR receptors or inflammatory stimuli recognized by interleukin receptors (Pober, 2002). Endothelial activation is a regulated process that occurs naturally; but, when not controlled, may favor the development of some pathologies, mainly from inflammatory origin (Lee et al., 2021). Endothelial activation is not permanent; it requires the activation and expression of some genes and molecules that keep the endothelial response and direct the process to angiogenesis or inflammatory response (Pober, 2002). This work used the PAPs PaDef and  $\gamma$ -thionin to determine whether these peptides regulate the endothelial activation process induced by VEGF. The results showed that the peptides and the VEGF-peptides mix, favor the inflammatory response, directly interfering with the angiogenesis stimulation process.

To establish whether the peptides regulate the angiogenic gene expression, we evaluate the expression of VEGFA4 (potent angiogenic) and VEGFA7 (anti-angiogenic) (Marin-Luevano et al., 2018) and evaluate if the defensins induce an inflammatory or angiogenic process. As expected, VEGF stimulation is related to angiogenesis regulatory genes. On the other hand,  $\gamma$ -thionin alone or in combination with VEGF decreases the angiogenic gene expression and the *E-selectin* gene expression, which suggests that  $\gamma$ -thionin could interfere with the VEGF stimulation, favoring an antiangiogenic gene expression. Interestingly, PaDef alone stimulates antiangiogenic gene *VEGFA7* and *E-selectin* gene expression, but in combination with VEGF, reduces the expression of these genes. Decreasing *E-selectin* expression suggests that the interaction of VEGF with PaDef occurs from the beginning of the addition of the treatment. These results indicate that PaDef and  $\gamma$ -thionin, in combination with VEGF, generate a negative regulation of the angiogenesis process, interfering with the angiogenic gene expression, as reported

(Falcón-Ruiz et al., 2023). Additionally, the production of nitrites showed no modifications concerning the control without treatments, which indicates it is related to the low eNOS expression found. According to the above results, the effect of peptides on regulating angiogenesis development was determined. Subsequently, to analyze the secretion levels of some inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), anti-inflammatory (IL-10), and chemokines (IL-8) molecules relevant in the endothelial activation associated with inflammation, protein levels present in supernatants were measured. Results showed that treatments with peptides don't affect the IL-8 and IL-6 secretion, but VEGF-PaDef and VEGF- $\gamma$ -thionin mixture increased the secretion of IL-8 and IL-6 concerning untreated cells. These results suggest that the inflammatory initial process could be stimulated, and the production of IL-8 suggests that these mixes may influence the chemotactic ability of endothelial cells. However, this attraction can be directed towards immune system cells or endothelial cells to favor angiogenesis (Folkman 2006). In addition, supernatants showed no detectable TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-10 proteins.

The presence of P-Selectin, PSGL-1, sCD40L, D-Dimer, and Tissue Factor in the supernatants was also evaluated. The increase of P-Selectin and PSGL-1 proteins in the treatments with the VEGF-peptides mix indicates that the endothelial activation is higher than in the treatments with the peptides alone. Interestingly, the high levels of D-dimer and tissue factor in the VEGF-peptides mix suggest that the activation is related to the inflammatory response inhibiting the angiogenesis process (Lee et al., 2021; Pober, 2002). These results are contrary to the obtained in the VEGF treatment, where the increase in the sCD40L and decrease in the PSGL-1 result in an angiogenic response (Chakrabarti et al., 2010). Also, the results of the evaluation of the assessment of apoptosis demonstrate that the peptides are not generating damage in the cells besides the high expression of the D-dimer and tissue factor, which usually are used as damage or inflammatory mark (Reinhart et al., 2002).

Based on these results, other mechanisms related to the endothelial activation process were evaluated. The adhesion of endothelial cells to a high protein matrix was tested using Matrigel, and the adhesion of peripheral blood lymphocytes to the surface of endothelial cells was assessed by flow cytometry. Both processes are related to essential steps in maintaining endothelial activation; the first (adhesion to a protein matrix) reflects the ability of endothelial cells to detach from the extracellular matrix in the stimulation of angiogenesis through the activation of metalloproteases and inhibition of adhesion molecules, such as VCAM and ICAM (Li et al., 2017). On the other hand, the adhesion of lymphocytes to the endothelium reflects the ability of endothelial cells to attract and stop the flow of cells in the bloodstream to subsequently favor the cellular diapedesis towards a specific site, which is related to the activation toward inflammation (Viallard & Larrivé, 2017). As is known, activated endothelial cells could promote angiogenesis and initiate a process to detach themselves from the extracellular matrix through the expression and activation of various metalloproteases, such as MMP-9, and inhibition of adhesion molecules (Aird, 2002; Viallard & Larrivé, 2017). Concerning endothelial cell adhesion to Matrigel, cells treated with VEGF showed a decrease in their adhesion, which is an expected result due to that VEGF stimulates the activation of the angiogenic process favoring the detachment of matrix cells (Chowdhury et al., 2017). On the other hand, interestingly,  $\gamma$ -thionin treatment increased cellular adhesion to the matrix by 25%, but the VEGF- $\gamma$ -thionin mixture had no effect. This may indicate that  $\gamma$ -thionin is inhibiting VEGF activity, probably by inhibiting the activation of metalloproteases and activating adhesion molecules; however, more studies are needed to corroborate this. However, treatment with PaDef did not affect adhesion, but the VEGF-PaDef treatment increased endothelial cellular adhesion by 4%, indicating that, like  $\gamma$ -thionin, PaDef avoids the VEGF activity.

Also, when evaluating the PBMCs adhesion to the endothelium, we observed a slight increase in the number of PBMCs that attached to monolayer cells treated

with PaDef, VEGF- $\gamma$ -thionin, VEGF-PaDef, compared to the VEGF. These results agree with the secretion of IL-8 and IL-6, so it is expected that the PBMCs would be stimulated to remain attached to the activated endothelium. These adhesion results show that PaDef and  $\gamma$ -thionin may affect endothelial activation initiated by VEGF, orienting the process to an inflammatory response and not towards the angiogenic response. The induction of molecules related to the inflammation in the presence of the VEGF-peptide mix shows that the interaction between peptides and VEGF reported before (Falcón-Ruiz, et al. 2023) could not be the only way of peptides action, because, in the presence of the mix, the endothelium could present an alternative pathway, not related with the activation of VEGF-VEGFR2 interaction. More experiments are necessary to clarify the pathways involved in the inflammatory response regulated by PAPs and VEGF in endothelial cells.

## **Conclusions**

The peptides PaDef and  $\gamma$ -thionin, in combination with VEGF, favor endothelial activation, stimulating the inflammatory response. Both peptides can interfere with the endothelial activation related to angiogenesis induced by VEGF in EA.hy926 endothelial cells.

## **References**

1. Aird, W. C. (2002). Endothelial cell dynamics and complexity theory. *Critical Care Medicine*, 30(5 SUPPL.). <https://doi.org/10.1097/00003246-200205001-00002>
2. Barillari, G., & Ensoli, B. (2002). Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 310–326. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.310-326.2002>

3. Carmeliet, P. (2000). Angiogenesis in health and disease. *General Pharmacology: Vascular System*, 35(5), 225–226. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(01\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(01)00111-2)
4. Chakrabarti, S., Rizvi, M., Morin, K., Garg, R., & Freedman, J. E. (2010). The role of CD40L and VEGF in the modulation of angiogenesis and inflammation. *Vascular Pharmacology*, 53(3–4), 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2010.05.003>
5. Chang, J. C. (2022). Molecular Pathogenesis of Endotheliopathy and Endotheliopathic Syndromes, Leading to Inflammation and Microthrombosis, and Various Hemostatic Clinical Phenotypes Based on “Two-Activation Theory of the Endothelium” and “Two-Path Unifying Theory” of Hemostasis. *Medicina (Lithuania)*, 58(9). <https://doi.org/10.3390/medicina58091311>
6. Chowdhury, A., Nandy, S. K., Sarkar, J., Chakraborti, T., & Chakraborti, S. (2017). Inhibition of pro-/active MMP-2 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking studies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 427(1–2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2903-y>
7. Deslouches, B., & Peter Di, Y. (2017). Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: Prospect for anticancer applications. *Oncotarget*, 8(28), 46635–46651. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16743>
8. Falcón-Ruiz, E. A., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2023). The plant defensins PaDef and  $\gamma$ -thionin inhibit the endothelial cell response to VEGF. *Peptides*, 165(February). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171008>
9. Flores-Alvarez, L. J., Jim, P., Ochoa-zarzosa, A., & Joel, E. L. (2023). The Antimicrobial Peptide  $\gamma$ -Thionin from Habanero Chile. *Molecules*, 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28093661>
10. Folkman, J. (2006). Antiangiogenesis in cancer therapy - Endostatin and its mechanisms of action. *Experimental Cell Research*, 312(5), 594–607. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.015>

11. Guzmán-Rodríguez, J. J., Ochoa-Zarzosa, A., López-Gómez, R., & López-Meza, J. E. (2015). Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. *BioMed Research International*, 2015(1). <https://doi.org/10.1155/2015/735087>
12. Jiménez-Alcántar, P., López-Gómez, R., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2022). PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*), a Plant Antimicrobial Peptide, Triggers Apoptosis, and Induces Global Epigenetic Modifications on Histone 3 in an Acute Lymphoid Leukemia Cell Line. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.801816>
13. Lee, H. J., Hong, Y. J., & Kim, M. (2021). Angiogenesis in chronic inflammatory skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222112035>
14. Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. (2017). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review). In *Oncology* (Vol. 16, pp. 687–702). <https://doi.org/10.3892/ol.2018.87330>
15. Marin-Luevano, P., Trujillo, V., Rodríguez-Carlos, A., González-Curiel, I., Enciso-Moreno, J. A., Hancock, R. E. W., & Rivas-Santiago, B. (2018). Induction by innate defence regulator peptide 1018 of pro-angiogenic molecules and endothelial cell migration in a high glucose environment. *Peptides*, 101(November 2017), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.01.010>
16. Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L., & Mişu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59(2), 455–467.

17. Patan, S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of Neuro-Oncology*, 50(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1023/A:1006493130855>
18. Pober, J. S. (2002). Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Research*, 4, S109–S116. <https://doi.org/10.1186/ar576>
19. Ramjiawan, R. R., Griffioen, A. W., & Duda, D. G. (2017). Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? *Angiogenesis*, 20(2), 185–204. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9552-y>
20. Reinhart, K., Bayer, O., Brunkhorst, F., & Meisner, M. (2002). Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Critical Care Medicine*, 30(5 SUPPL.). <https://doi.org/10.1097/00003246-200205001-00021>
21. Viallard, C., & Larrivée, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>

### **3. Capítulo III. Un nuevo método para determinar la adhesión de células polimorfonucleares de sangre periférica (PMN) a células endoteliales mediante citometría de flujo**

#### **A new method to determine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) adhesion to endothelial cells by flow cytometry**

Elba Andrea Falcón-Ruiz<sup>1</sup>, Marisol Báez-Magaña<sup>1</sup>, Joel Edmundo López-Meza<sup>1</sup>,  
Alejandra Ochoa-Zarzosa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro. Posta Veterinaria. C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

\*Corresponding author. Tel/Fax: 52+ 443 2958029

E-mail address: [alejandra.ochoa@umich.mx](mailto:alejandra.ochoa@umich.mx), [ochoaz@umich.mx](mailto:ochoaz@umich.mx) (A. Ochoa-Zarzosa)

Correspondence address: Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, C.P. 58893, Morelia, Michoacán, México.

#### **Resumen**

La activación endotelial es un proceso en el cual las células expresan en su superficie moléculas que favorecen la respuesta inflamatoria. Una característica de

esta activación es la capacidad del endotelio para retener células del sistema inmunológico a través del proceso de adhesión. Existen diversos métodos de uso rutinario para determinar la adhesión celular; sin embargo, estos tienen dificultades para realizar una evaluación cuantitativa. En este trabajo se propone un nuevo método para evaluar cuantitativamente la adhesión celular asociada a la activación endotelial. Mediante el uso de citometría de flujo se determinó la cantidad de células polimorfonucleares de sangre periférica (PMN) adheridas a la superficie de células EA.hy926. Como estímulo de la activación endotelial se empleó el lipopolisacárido (LPS). Las PMN fueron teñidas con el colorante vital Calceína-AM, luego se pusieron en contacto con las células EA.hy926, y se evaluó su adhesión por citometría de flujo. La adhesión se determinó a través de la fluorescencia y la complejidad. De acuerdo a los resultados, este método es comparable a los basados en microscopía, teniendo como beneficio adicional que arroja valores cuantificables para determinar la significancia del proceso de activación. Adicionalmente, el coeficiente de variación fue menor al 5%, lo cual le da certeza estadística.

## **Abstract**

Endothelial activation is a process in which cells express on their surface molecules that favors the inflammation process. When the endothelium is activated, it can retain immune system cells. There are several methods of routine use to determine cell adhesion; however, these have difficulty performing a quantitative evaluation. The present work was designed to develop a quantitative method to evaluate cell adhesion associated with endothelial activation. In this protocol, flow cytometry determines the number of immune cells (dyed with a vital dye) which remained attached to the endothelial surface after an activating stimulus. Stained PBMCs get in contact with EA.hy926 cells, and then adhesion was evaluated by flow cytometry. Adhesion was determined through fluorescence and complexity. According to the

obtained results, the technique is comparable to the use of microscopy techniques having an additional benefit that yields quantifiable values to determine the significance of the activation process. Lipopolysaccharide (LPS) was used as a positive control, as it is a potent activator, having results consistent with what was reported in the literature. Additionally, the coefficient of variation of the technique indicates values less than 5%, which validates the method with precision.

## **Introduction**

Endothelial activation is an essential process for stimulating the inflammatory response. When the endothelium is activated expresses on its surface cell adhesion molecules such as VCAM and ICAM; additionally, interleukins (IL) are secreted and attract immune system cells, such as peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (Pober, 2006). The circulating immune system cells receive attraction stimulus through membrane receptors, redirecting towards the endothelium, stopping its cell bearing, and carrying out the process of diapedesis (Torres et al. 2017; Ulbrich, Eriksson, and Lindbom 2003). The specific influence of inflammatory response on endothelial activation may be assessed measure different activation parameters, such as IL secretion, metalloproteases (MMP) activation, expression regulation of immune response genes (Hou et al., 2019), or microscopy methods to determine cell adhesion (Bian et al. 2017).

The cell adhesion can be determined by microscopy and can establish the direct interaction site between cells using different fluorescent dyes or antibodies (Bian et al. 2017). However, the operator's ability is critical to obtain good images, making quantifying the interaction difficult. For the above, developing a method to establish quantitative data to evaluate the cell-cell interaction is necessary. In this work, we propose a new protocol that uses flow cytometry to determine quantitatively the adhesion of immune system cells to endothelial cells. The method is reliable and comparable to the microscopy techniques.

## **Materials and Methods**

### Reagents

- PBS: Phosphate-Buffered Saline 1X.
- Complete DMEM high glucose (Sigma, Cat. D5348), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest), 100 U/mL penicillin, and streptomycin (Gibco), sodium pyruvate 1 mM and endothelial growth supplement from bovine pituitary (3 mg/mL) (Sigma, Cat. E0760-15MG). DMEM complete medium was named "SM" (Supplemented medium).
- Incomplete DMEM high glucose (Sigma, Cat. D5348) supplemented with heat-inactivated 1% FBS (Biowest). DMEM incomplete medium was named "SFM" (Serum-free medium).
- Trypsin from bovine pancreas (Sigma, Cat: T9201-1G).
- LPS: Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (Sigma, Cat. L2880).
- Calcein-AM (Invitrogen Cat. C1430).
- RPMI1640 medium with Glutamax (final concentration 2 mM), pyruvate (final concentration 1 mM). RPMI complete medium was referred to as "RPMI".

### Materials

- Vacutainer tubes with EDTA.
- Conical tubes of 15 mL.
- Micropipettes.
- Pasteur pipettes.

### Equipment

- Cytometer BD Accuri C6.

### *Cell culture*

The human endothelial cell line EA.hy926 (Line established by primary fusion of human umbilical cord cells with clone A549, show an additional need for growth factors, maintain endothelial cell characteristics) (kindly donated by Dr. Bruno Rivas-Santiago from Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Biomédica Zacatecas, Zacatecas, México) was used in this work. The cells were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM high glucose, Sigma), supplemented with 10% FBS (Biowest), 100 U/mL penicillin, and streptomycin (Gibco), sodium pyruvate 1 mM, and endothelial growth supplement from bovine pituitary (3 mg/mL) (Sigma). The cells were grown in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.

The protocol was performed in 4 steps: 1) Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation as reported by Domínguez-Andrés et al. 2021; 2) EA.hy926 endothelial cell treatment for activation; 3) Interaction of PBMC with endothelial cells, and 4) Flow cytometry analysis.

## **Protocol**

### **Step 1. PBMCs isolation**

#### Sample

1. Collect 4 mL of venous blood (from 3 different donors) in vacutainer tubes with EDTA. Mix gently to avoid hemolysis.
2. Transfer blood to 15 mL tubes. Add PBS (1:1). Mix slightly.
3. Spin at 800 x g for 10 minutes.
4. Recover the PBMCs layer or buffy coat, avoid taking other layers, and put the buffy coat in a new tube.

#### Isolation of PBMCs from the buffy coat

1. Add PBS to the buffy coat (adjust the volume of each tube to 10.5 mL).

2. In a 15 mL tube, add 3.5 mL of Ficoll-Paque, and gently add the mixture of buffy coat-PBS on the Ficoll-Paque (avoid mixing the layers).
3. Spin at 615 x g for 30 minutes at room temperature with acceleration 1.
4. Recover the PBMCs layer using sterile Pasteur pipettes (do not take the cells attached to the tube wall). Collect the PBMCs in 15 mL tubes.
5. Add PBS to 4°C, up to a final volume of 14 mL.

Washes of PBMCs (next steps should preferably be performed at 4°C)

1. Spin at 550 x g for 15 minutes at 4°C.
2. Remove the supernatant (join the cell pellets if several tubes were used) in 15 mL conical tubes.
3. Wash with cold PBS, adjusting the final volume to 15 mL.
4. Spin at 550 x g for 10 minutes at 4°C.
5. Remove the supernatant and repeat the washing process.
6. Re-suspend cells in RPMI and keep them in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C until use.

**Step 2. Activation of EA.hy926 endothelial cells**

Cells are treated with LPS (100 ng/mL) to activate, as reported by (Hou et al., 2019) SFM is used as a negative control.

Endothelial cell preparation.

1. Seed  $14 \times 10^3$  cells in 48-well plates, with SM.
2. Incubate cells for 24 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C.
3. Remove the SM, add SFM to the cells, and incubate for 24 h to synchronize cells.
4. Remove the supernatant and add the treatments (LPS 100 ng/mL, SFM, SM). Incubate for 24 h.

### **Step 3. Interaction of PBMCs with endothelial cells**

This protocol aims to determine the adhesion of PBMC cells to the surface of endothelial cells. Therefore, a dye (Calcein-AM) marks and differentiates the PBMCs.

#### PBMCs staining

*Important: This step should be performed at least one hour before the end of 24 hours of stimulation of EA.hy926 cells.*

1. Count the PBMCs collected in the isolation step and determine the cells required for the experiment. For each well is necessary  $25 \times 10^3$  PBMCs. Additionally, controls for cytometry should be considered, i.e., keeping stained and undyed PBMCs.
2. Once the number of PBMCs to be stained has been determined, collect the cells in 1.5 mL microtubes and re-suspend in RPMI medium with  $2 \mu\text{M}$  of Calcein-AM. Use a maximum of 1 mL of medium with Calcein-AM for every million PBMCs required.
3. Incubate for 20-30 minutes in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^\circ\text{C}$ .
4. Spin the PBMCs at 1200 rpm for 5 minutes.
5. Perform 2 washes of the pellet with 1 mL of PBS.
6. Re-suspend cells in RPMI medium to a concentration of  $25 \times 10^3$  cells / 200  $\mu\text{L}$  of RPMI.

NOTE: The interaction ratio between endothelial cells: PBMCs is 1:1.6

#### EA.hy926 – PBMCs interaction

1. At the end of incubation time with treatments, wash endothelial cells with PBS.
2. Add PBMCs (previously dyed. Step 3.1) to EA.hy926 cells. Leave the interaction for 1 h in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^\circ\text{C}$ .

3. After the interaction period, remove the supernatant and the PBMCs that do not adhere to the endothelial cells.
4. Wash gently with PBS.
5. Add trypsin (390  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to remove the cells from the well.
6. Collect the cells by centrifugation at 1500 rpm for 10 minutes.
7. Wash with PBS at 4°C. Spin at 1500 rpm for 5 minutes.
8. Keep it on ice until its analysis in the cytometer.

#### **Step 4. Flow cytometry**

The cytometer used in this validation corresponds to a BD Accuri C6. The channel to determine the Calcein-AM fluorescence corresponds to the FL1 channel. Samples are suspended in 100  $\mu\text{L}$  of PBS + trypan blue at 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  as Srivantava et al. 2011 proposed to decrease the autofluorescence. To determine the interest region, undyed and dyed PBMCs were used.

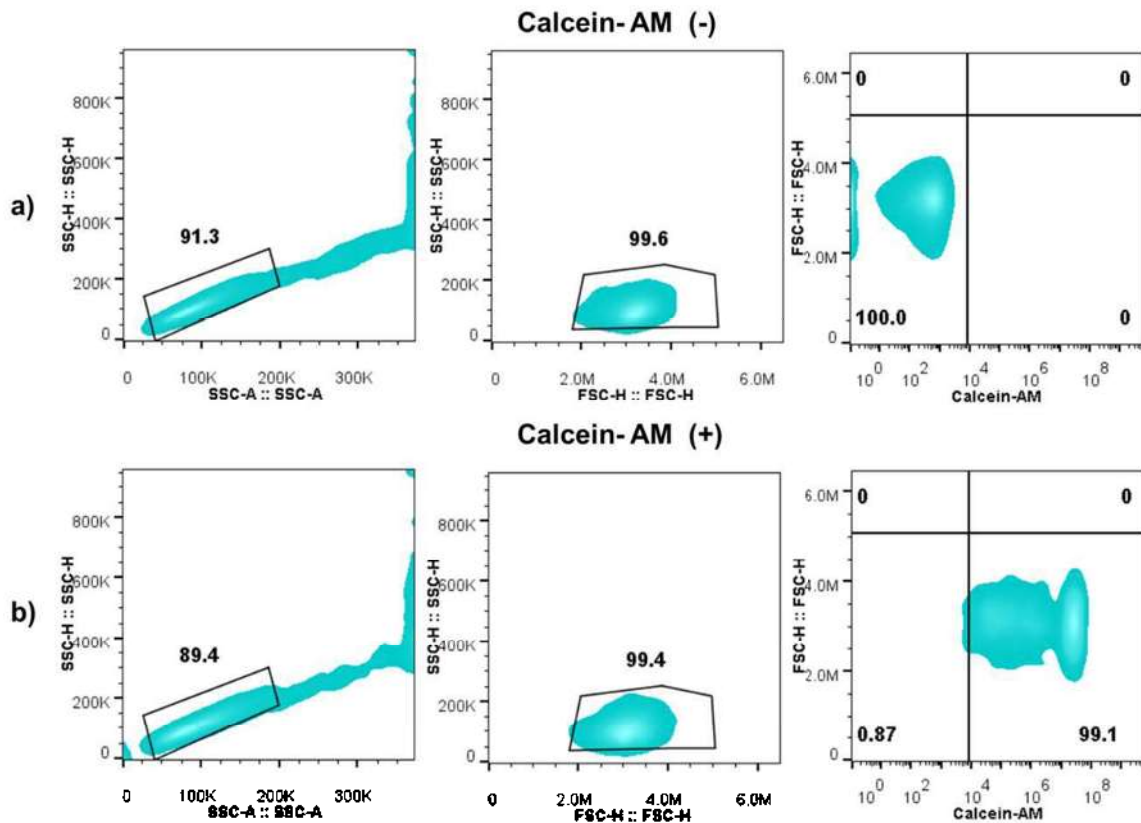
#### **NOTES:**

Sample collection was limited to a final volume of 80  $\mu\text{L}$ .

Once the population of interest region had been determined, the treated samples were collected, maintaining the same parameters considered in the controls.

- a) To determine the population of interest, use the PBMCs unstained and select the region. Use this parameter to specify the autofluorescence of the PBMC cells (Figure 1).
- b) Once the interest region is determined, use the PBMCs dyed to determine the Calcein-AM fluorescence.
- c) Repeat a) and b) steps using the sample of EA.hy926 cells. This step is important to separate the corresponding region of PBMCs and endothelial cells.

- d) The region of interest and the parameters need to keep constant in the complete experiment.
- e) Once the controls are determined, the samples for analyses could be evaluated.



**Figure 1. Selection of PBMCs area.** The plots show the selection areas to determine the PBMCs population. a) Negative Calcein-AM staining and b) Positive Calcein-AM staining. Left: single cells. center: PBMCs population region. Right: detection region of Calceine-AM

### Data analysis

To determine the PBMCs stained population:

- a) Obtain the “frequency parameter” given by the analysis software (recommended FlowJo) that corresponds to the calceine (+) region.

b) Compare the statistical difference concerning the positive activation control (LPS).

The data were analyzed, comparing data from 3 independent experiments (recommended PRISM 8.0.2 software) by performing a *t-student* analysis. The results are reported as the mean  $\pm$  the standard error (S.E.), and the significance level was set at  $p < 0.05$ .

## **Results and Discussion**

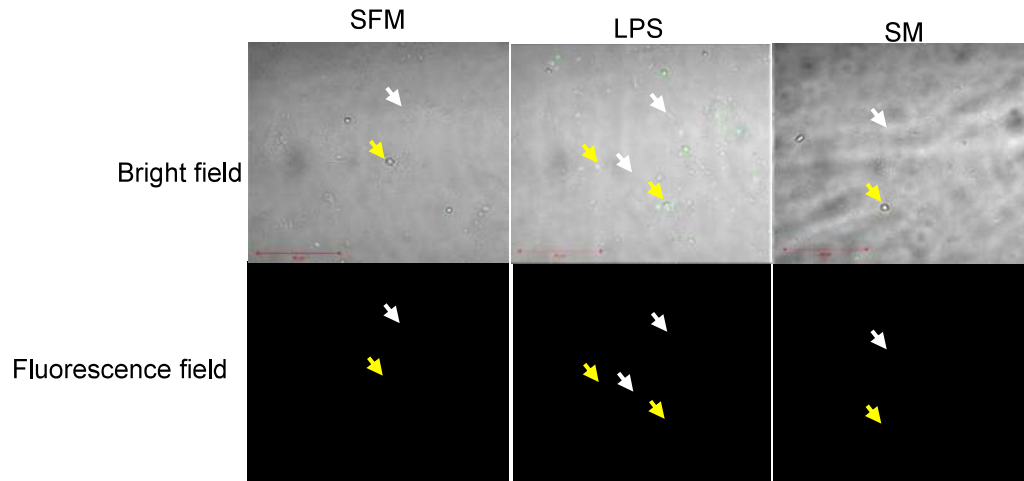
This protocol could help to evaluate the inflammatory response because the inflammation increases the attached cells to the endothelium after endothelial activation. So, this method is based on the concept of endothelial activation, where selectins, integrin-ligands, and adhesion molecules are highly expressed on endothelial cell surface (Pober 2002).

Traditionally, the choice method for determining the adhesion of lymphocytes to endothelial cells is microscopy, where the image analysis establishes whether there is a cellular adhesion (Bian et al., 2017). However, this technique lacks an effective method for quantification because the operator determines the analysis area and doesn't consider the whole sample. The new method allows quantitative results and better analysis of the effects of activation molecules in the endothelium.

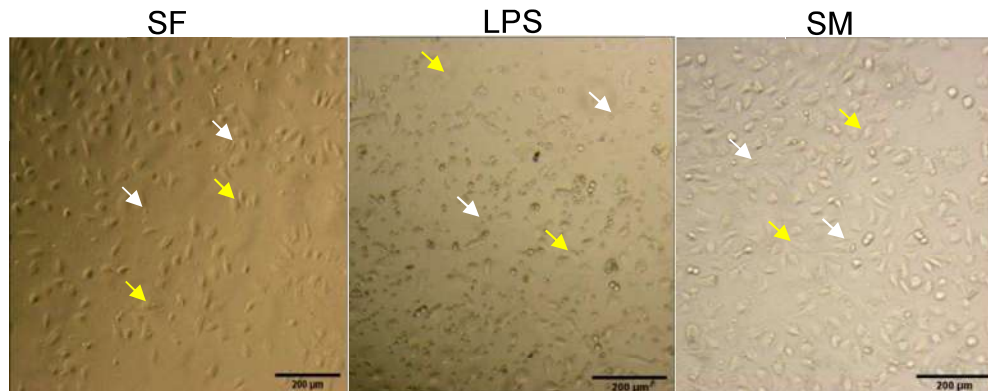
We performed a comparative analysis of the microscopy and flow cytometry to validate the new method. Three independent experiments were carried out using the blood samples of 3 health donors in each experiment. Each experiment was conducted with a pool of PBMC cells. The data obtained from the cytometer correspond to the at least 3,000 events collected. These data were normalized concerning the untreated medium (SFM), and statistical analyses were performed for validation.

Microscopy fluorescence images showed adhered cells (Figure 2) to the endothelial cell monolayer, which was higher in LPS-cells activated. Also, the

difference in the number of PBMCs attached to the endothelial monolayer was evident without a special stain (Figure 3), and results were comparable to those obtained using fluorescence. However, was not feasible carried a quantitative analysis.



**Figure 2. PBMCs attached to the EA.hy926 cells.** The fluorescence microscopy pictures show the presence of dyed PBMC (white arrows) attached to the endothelial cells (yellow arrows). Scale bars represent 50  $\mu\text{m}$ . The images were taken at 40X. SFM: Serum-free medium, SM: Medium with serum and growth factors, LPS: Lipopolysaccharide 100 ng/mL. Top panel: bright field. Bottom panel: fluorescence field



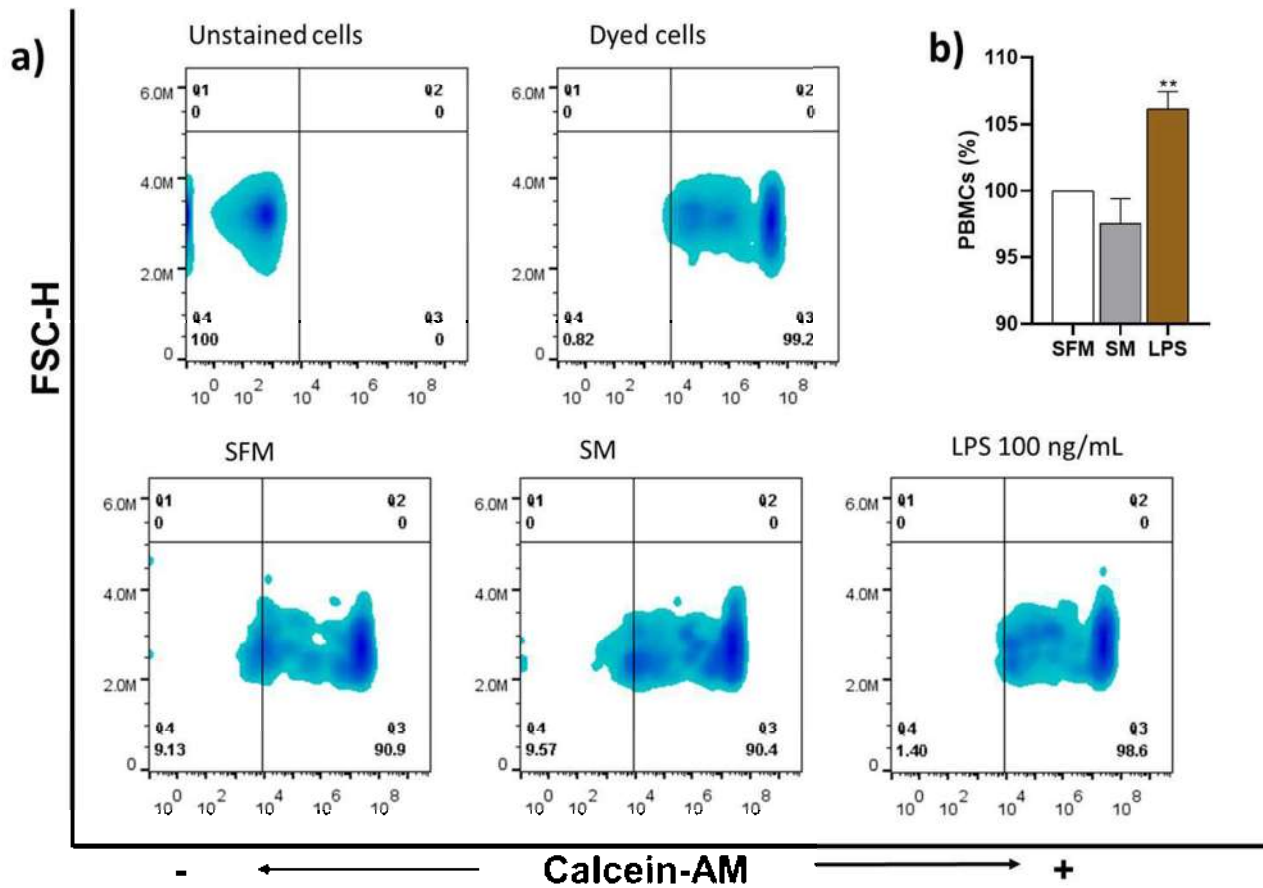
**Figure 3. PBMCs attached to the EA.hy926 cells.** The optical microscopy pictures show the presence of undyed PBMC (white arrows) attached to the endothelial cells (yellow arrows). Scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ . The images were taken at 10X. SFM: Serum-free medium, SM: Medium with serum and growth factors, LPS: lipopolysaccharide 100 ng/mL.

The results obtained by flow cytometry (Figure 4) showed that the treatment with LPS (100 ng/mL) increased the PBMCs adhesion to endothelial cells by 8% concerning the cells without treatment (negative control). In addition, cells treated with SM did not show an increase in PBMCs attached to EA.hy926. These results coincided with those found in the microscopy method but can be quantified. Additionally, we determined the coefficient of variation to establish if the method is reliable. The following equation was used to determine the coefficient of variation:

$$\text{Coefficient of variation} = (\text{mean} / \text{standard deviation}) \times 100$$

As indicated in Table 1, the value of the coefficient of variation in each treatment was less than 5%, which is within the limits allowed for method validation (Freund, R, et al. 2010).

Some of the advantages of this protocol refer to the uses of a method that can't be manipulated for the user. The first step in the cytometry is to determine de interest population, and after that, the analysis is carried out only in this area, quantifying the fluorescence. This is complicated with the microscopy approach because the selection of the analysis area is defined by the operator, which implies a component of subjectivity. Also, the multiple manipulation steps could affect the preservation of the sample, which has challenging to obtain reliable data. On the contrary, the new method reduces the manipulation steps after the cell interaction, allowing better sample maintenance. Additionally, using a cytometer gives a great sensibility to detect the emission of fluorescence of the dyes, allowing the detection of small samples.



**Figure 4. PBMCs adhesion to the EA.hy926 cells.** Cells were analyzed by cytometry. **a)** Representative plots of the treatments. **b)** Quantification of PBMCs attached to the EA.hy926 cells. Mean  $\pm$  SEM. t-Student.  $p > 0.5$ . \*\* indicates a significant difference concerning SFM. SFM: serum-free medium, SM: complete medium. LPS: lipopolysaccharide.

**Table 1. PBMC adhesion values obtained from 3 independent experiments**

|     | 1 <sup>st</sup><br>(%) | 2 <sup>nd</sup><br>(%) | 3 <sup>rd</sup><br>(%) | Mean<br>(%) | SD         | Variation  |
|-----|------------------------|------------------------|------------------------|-------------|------------|------------|
| SFM | 100                    | 100                    | 100                    | 100         | 1.421 E-14 | 1.421 E-14 |
| SM  | 96.307                 | 101.202                | 95.102                 | 97.537      | 3.230      | 3.312      |
| LPS | 108.528                | 105.808                | 104.082                | 106.169     | 2.241      | 2.111      |

## **Conclusion**

The method proposed in this work is reliable and represents an alternative to analysis cell adhesion by flow cytometry.

## **Expected outcomes**

The present method improves interaction cell-cell analyses because data can be quantitative. Besides, this protocol was optimized to analyze the endothelial cell-PBMC interaction and could be improved to determine other interaction cells.

## **Limitations**

This is an *in vitro* experiment of a complex interaction that may occur naturally in the organisms. The interaction between PBMCs-endothelial cells is different depending on the site of origin of the endothelium. This protocol lets us know whether an interaction is possible, but this can't show the precise area of the joint or the mechanism. Also, using a cytometer is less common than microscopes in laboratories.

## **Troubleshooting**

### Problem 1

If the PBMCs samples origin is from different donors, the results could be affected.

### Solution 1

Each PBMC sample comes from individuals with different immune responses. We suggest use a mix of various donors to avoid individual responses. If the protocol is performed with a monocyte cell line, the expectant variation should be lesser than if a pooled donor was used.

### Problem 2

PBMC cells don't dye properly.

### Solution 2

To determine the correct dyed concentration is recommended to probe different concentrations according to the manufacturer's recommendation. Also, an extended incubation period with the dyed could be considered.

### Problem 3

After the interaction period, the endothelial cells are shown to be dyed.

### Solution 3

To avoid that endothelial cell dyeing, we suggest performing enough washed steps on the PBMCs before the interaction step (to eliminate the dye in the supernatant of PBMCs).

### Problem 4

The PBMCs are dying.

### Solution 4

If the previous interaction time step is too long, the population of total PBMCs could be affected, especially the neutrophils, due to their short lifetime. The PBMCs should be incubated in an RPMI medium until they are used. When required, cells must be counted using vital dyes (ca. trypan blue) to calculate the live cell's proportion.

### **References**

1. Bian, Tianying et al. 2017. "Human  $\beta$ -Defensin 3 Reduces TNF- $\alpha$ -Induced Inflammation and Monocyte Adhesion in Human Umbilical Vein Endothelial Cells." *Mediators of Inflammation* 2017.
2. Domínguez-Andrés, Jorge et al. 2021. "In Vitro Induction of Trained Immunity in Adherent Human Monocytes." *STAR Protocols* 2(1).

3. Freund, R.; Wilson, W.; Mohr, D. 2010. *Statistical methods*. Third ed. Academic Press-Elsevier Inc.
4. Hou, Xuhui, Songbai Yang, and Jian Yin. 2019. "Blocking the REDD1/TXNIP Axis Ameliorates LPS-Induced Vascular Endothelial Cell Injury through Repressing Oxidative Stress and Apoptosis." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 316(1): C104–10.
5. Pober, Jordan S. 2002. "Endothelial Activation: Intracellular Signaling Pathways." *Arthritis research* 4: S109–16.
6. Srivantava, Girish K. et al. 2011. "Trypan Blue Staining Method for Quenching the Autofluorescence of RPE Cells for Improving Protein Expression Analysis." *Experimental Eye Research* 93: 956–62.
7. Torres, Pedro et al. 2017. "The Salivary Peptide Histatin-1 Promotes Endothelial Cell Adhesion, Migration, and Angiogenesis." *FASEB Journal* 31(11): 4946–58.
8. Ulbrich, Holger, Einar E. Eriksson, and Lennart Lindbom. 2003. "Leukocyte and Endothelial Cell Adhesion Molecules as Targets for Therapeutic Interventions in Inflammatory Disease." *Trends in Pharmacological Sciences* 24(12): 640–47.

#### **4. Capítulo IV. “Vasos sanguíneos, las carreteras de mi cuerpo”**

**Publicado en el Número 50 (Año 9:43-49) de la revista de divulgación SABER MÁS, con fecha de publicación del 30 de abril de 2020 (Registro ISSN: 20077041).**

## ARTÍCULO

# Vasos sanguíneos, las carreteras de mi cuerpo

Elba Andrea Falcón Ruíz y Alejandra Ochoa Zarzosa



*Elba Andrea Falcón Ruíz*, estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.  
[ea.falconruiz@gmail.com](mailto:ea.falconruiz@gmail.com)

*Alejandra Ochoa Zarzosa*, profesora e investigadora del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.  
[ochoaz@umich.mx](mailto:ochoaz@umich.mx)

**D**e manera constante, el organismo requiere de mantenimiento y comunicación entre todos los órganos. Para ello, es necesaria la presencia de una red que lo facilite, la cual está compuesta por los **vasos sanguíneos**. Al proceso encargado de formarlos, se le conoce como **angiogénesis** y comienza desde la etapa embrionaria. Sin embargo, si hay fallas en su regulación, la angiogénesis puede relacionarse con algunas enfermedades como la artritis reumatoide, la psoriasis, la retinoplastia diabética, o incluso, favorecer la aparición o **crecimiento de tumores**. De esto te hablaremos en este artículo, describiendo cómo se comunican los órganos de nuestro cuerpo, y para qué sirven esas vías de comunicación, en particular, los vasos sanguíneos.

### ¿Cómo se forman los vasos sanguíneos y cuál es su función?

Al igual que en una carretera de alta velocidad, en el interior del cuerpo humano a cada segundo se desplazan miles de células de manera muy rápida, gracias a lo cual, el organismo se mantiene en comunicación constante, permitiendo la distribución de nutrientes, e incluso, transportando desechos. Esta comunicación ayuda a que se lleve a cabo el **reclutamiento de células inmunológicas** (neutrófilos, macrófagos, linfocitos) en cada parte del cuerpo, ya sea para combatir patógenos o para mantener la estabilidad de los tejidos. El transporte de los diversos tipos celulares, depende de una buena "carretera de distribución", compuesta por los vasos sanguíneos que forman una red interna.

La formación de vasos sanguíneos ocurre por el proceso llamado angiogénesis, que por definición, corresponde a la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de otros preexistentes, que inicia desde la etapa embrionaria y se mantiene a lo largo de nuestra vida.

La angiogénesis ocurre de forma natural en procesos fisiológicos como en la ovulación, menstruación, reparación de heridas y mantenimiento de los tejidos, debido al equilibrio existente entre diversas moléculas conocidas como factores **pro-angiogénicos** y factores **anti-angiogénicos**. Sin embargo, cuando dichas moléculas no están reguladas de manera adecuada, favorecen a diversas condiciones patológicas relacionadas con respuestas inflamatorias.

#### Procesos de formación de vasos sanguíneos

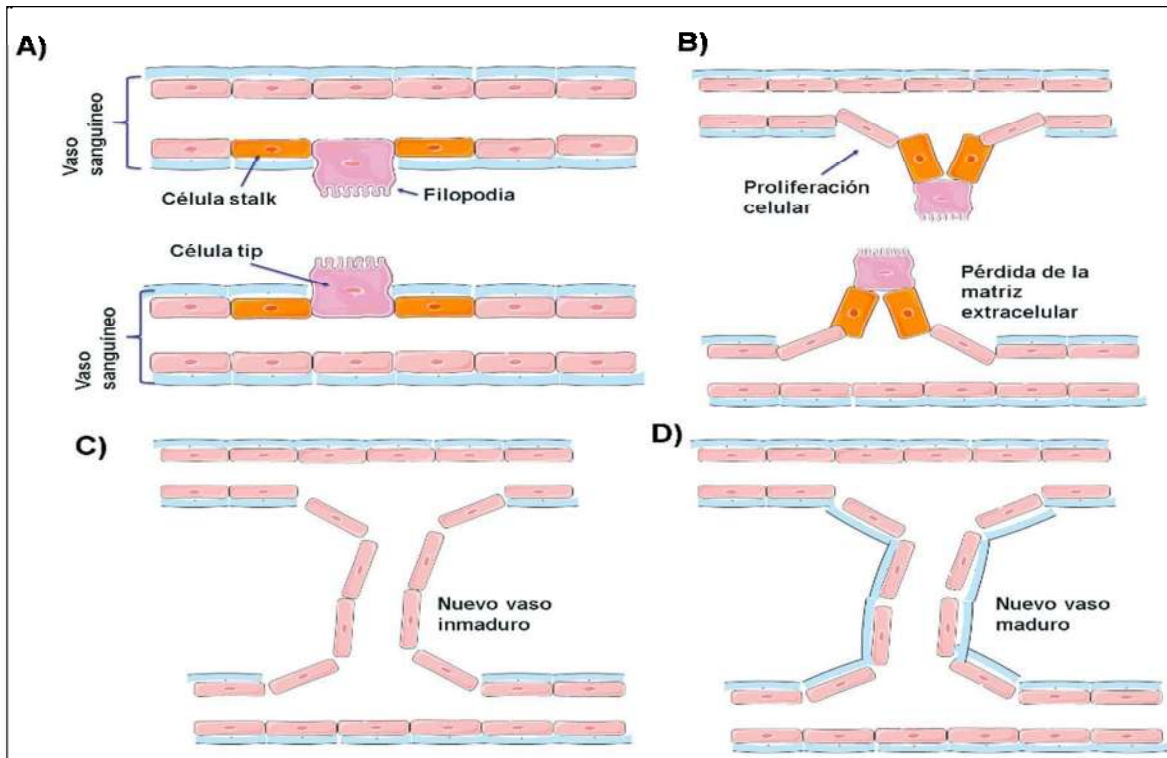
Los vasos sanguíneos están formados por capas, las cuales corresponden principalmente a una capa interna de **células endoteliales**, recubiertas de una matriz extracelular y pericitos (células contráctiles que rodean los capilares) que ayudan a mantener la estructura tubular y a dar soporte. Para que se inicie la formación de un vaso sanguíneo (nuevo), es necesario un **estímulo angiogénico**. La principal molécula angiogénica es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), el cual estimula a una **célula endotelial** para comenzar un proceso de elongación. Esta célula es conocida como célula "tip" ("punta" por su

traducción del inglés), mientras que sus células vecinas inmediatas, se conocen como células "stalk" ("tallo" por su traducción del inglés).

La **célula tip** secreta moléculas como Angiogenina-2 (Ang-2) para desprender a los pericitos de la matriz extracelular, lo que desestabiliza la estructura tubular, posteriormente proteínas del tipo metaloproteinasas (que destruyen proteínas ayudándose de un metal), degradarán a la matriz celular que rodea a las células tip y stalk; esta degradación permite iniciar el proceso de proliferación y elongación celular. La célula tip desarrolla unas prolongaciones llamadas "filopodia", que dirigen el rumbo hacia el cual el nuevo vaso naciente se prolongará, mientras que las **células stalk** proliferarán aumentando la longitud del vaso nuevo, el cual detendrá su proliferación cuando haga contacto con un vaso sanguíneo preexistente, al cual se conectará.

Hasta este punto, se considera un vaso inmaduro; para madurar, se reclutan pericitos que fortalecerán la unión de las células endoteliales, y se recuperará la matriz extracelular. Una vez que el vaso está maduro, se abre el canal de comunicación permitiendo el paso de sangre.

La angiogénesis suele confundirse con otros procesos similares que involucran células endoteliales, que son células que recubren el interior de los vasos sanguíneos, los cuales tienen relación con la formación de vasos linfáticos (linfangiogénesis), formación de arterias (aterogénesis) y principalmente se suele confundir con la vasculogénesis, que involucra el desarrollo de vasos sanguíneos, pero ésta es a partir de células precursoras o células madre, no de vasos preexistentes. Esto último se da en etapas embrionarias.



*Proceso de formación de un nuevo vaso sanguíneo. A partir de dos vasos preexistentes, se desarrolla uno nuevo al estimular células endoteliales de cada vaso, los cuales se unirán por medio de los filopodios tras un proceso de elongación (Modificado de Servier Medical Art)*

### Angiogenesis patológica

Como ya se mencionó, el proceso de la angiogenesis debe presentarse de manera equilibrada e iniciarse bajo condiciones fisiológicas; es decir, no todo el tiempo se están generando vasos sanguíneos nuevos, sino que solo se forman con estímulos específicos en situaciones particulares. Una de las condiciones que puede favorecer la angiogenesis es la inflamación, y esto puede producir enfermedades sistémicas o lesiones mecánicas, y/o en condiciones de hipoxia (falta de oxígeno).

Algunas enfermedades como la **artritis reumatoide** o la **psoriasis**, se caracterizan por presentar de manera crónica un estado inflamatorio, donde se están produciendo constantemente mensajeros químicos conocidos como citocinas, que llevan a cabo un papel fisiológico importante en la regulación de diversos procesos. De manera interesante, se ha determinado que muchas citocinas también participan en la angiogenesis; por ejemplo, si se produce una herida profunda el tejido se inflama y requiere de una correcta irrigación sanguínea para repararla, por lo que se generan vasos sanguíneos nuevos en este proceso de reparación tisular.

Por otro lado, cuando disminuye la concentración disponible de oxígeno, las células producen el factor inducible de **hipoxia** (HIF, por sus siglas en inglés), que actúa como una señal de alerta para estimular a las **células endoteliales** a formar más vasos sanguíneos, y con esto, aumentar la concentración de oxígeno. Esto permite entender, la razón por la cual los tumores cancerosos son capaces de aumentar su tamaño a gran velocidad, y es que estas masas para mantenerse en crecimiento, requieren grandes cantidades de nutrientes y de oxígeno, agotando las provisiones cercanas.

Se ha determinado que las **células tumorales** son capaces de aumentar la producción de HIF, lo que trae como consecuencia la producción rápida de vasos sanguíneos alrededor de la masa tumoral, ayudando a la **supervivencia del tumor**. Aunado a esto, el aumento en la presencia de vasos sanguíneos cercanos a la masa tumoral, favorece también el **desarrollo de metástasis**, pues, si una célula tumoral se desprende de esta masa, podría ser capaz de transportarse por alguno de los nuevos vasos formados, y con esto, viajar a sitios alejados de la zona de crecimiento del tumor diseminando este tipo de células.

Las citocinas son pequeñas moléculas de carácter proteico, necesarios para la comunicación celular que desencadenan respuestas específicas, como los procesos inflamatorios o los antiinflamatorios. Las citocinas se conocen como interleucinas (IL), que son secretadas prácticamente por cualquier célula del cuerpo, pero para poder producirse, la mayoría de éstas, requieren de un estímulo previo como una señal de daño o la presencia de algún patógeno. Cuando una célula reconoce ya sea un daño o algún patógeno, informa a otras células mediante la secreción de citocinas, e incluso puede atraer más células al sitio de daño por la intervención de otro tipo de citocinas llamadas “quimiocinas”, moléculas especializadas para atraer diversos tipos de células.

#### ¿Todos los vasos sanguíneos nuevos son iguales?

La respuesta es NO. Dentro del proceso de la angiogénesis hay formación de diferentes tipos de vasos sanguíneos nuevos. Los vasos sanguíneos que se pueden formar en condiciones fisiológicas, presentan características más estables, las células se organizan mejor y sin dejar espacios, y producen las **proteínas de la matriz extracelular** de forma constante; mientras que, cuando se requiere un vaso sanguíneo para mantener un tumor, el crecimiento del vaso es rápido y desorganizado, puesto que el tumor crece y requiere nutrientes y oxígeno de manera descontrolada.

En este caso, la angiogénesis se “acelera” en la formación del vaso y en la producción de la matriz extracelular, lo que trae como consecuencia una **arquitectura deformada e inestable** de los vasos sanguíneos, susceptible a modificar la permeabilidad capilar. Algunos estudios sugieren que, precisamente, esta característica anormal de los vasos tumorales, es lo que favorece la migración de células cancerosas y el establecimiento de la metástasis, por lo que en los últimos años se ha visto a los **vasos sanguíneos de los tumores**, como un

posible **blanco terapéutico** para evitar el crecimiento de éstos.

Si en sentido figurado, se considera a un tumor como un organismo independiente, éste necesita crecer, por lo que estar nutrido y tener un ambiente favorable es indispensable. Pero este tumor no está solo, tiene competencia por los nutrientes con el resto del organismo, entonces **¿Qué estrategia desarrolla para sobrevivir?** Al respecto, se ha considerado metafóricamente que un tumor canceroso “pelea” y “engaña” al organismo para obtener sus nutrientes, o simplemente los “secuestra”. Por poner un ejemplo, se ha visto que las células cancerosas producen grandes cantidades de moléculas como HIF e IL inflamatorias, lo que alerta al organismo de que algo está pasando y que por tanto requiere atención. El organismo en respuesta, aumenta la cantidad de nutrientes en la zona, y las células cancerosas toman dichos nutrientes, evitando que éstos lleguen a más tejidos.

Considerando lo anterior, resulta lógico pensar que una estrategia para evitar el crecimiento y diseminación de las células cancerosas, es **el bloqueo de**

**los caminos que las nutren**. En esta analogía, los caminos son los vasos sanguíneos por donde llega el oxígeno y los nutrientes al tumor.

#### Bloqueo de la angiogénesis como terapia en el tratamiento de tumores

El bloqueo de la angiogénesis, pareciera ser una estrategia infalible en el tratamiento de tumores; sin embargo, decirlo es mucho más fácil que hacerlo, pues se ha visto que estas células son capaces de desarrollar **tácticas que engañan al sistema** para seguir produciendo vasos sanguíneos que les permitan mantenerse. Muchas de las terapias contra tumores cancerosos han adoptado una **estrategia mixta**, es decir, además de la quimioterapia para matar a las células tumorales, se utiliza en conjunto medicamentos como Bevacizumab® o Talidomida® para disminuir la formación acelerada de los vasos sanguíneos.

Estas terapias combinadas, han dado buenos resultados en algunos tipos de tumores, aunque esta estrategia no ha funcionado para todos los tipos de cáncer, principalmente debido al tipo de moléculas que afecta. Actualmente, se sigue en

la búsqueda de moléculas que ayuden a bloquear estos mecanismos. Uno de los principales inconvenientes con esta terapia, son los **efectos secundarios adversos**, pues al bloquear un proceso que está presente prácticamente en todo el organismo (la angiogénesis), se alteran procesos fisiológicos vitales que pueden ir desde hemorragias y coágulos, hasta perforación gastrointestinal, daño al sistema nervioso central y el corazón.

### Formación de vasos sanguíneos en enfermedades crónico-degenerativas

Hasta ahora hemos hablado de tumores cancerosos y de la ventaja que obtienen al aumentar la angiogénesis, pero **¿Qué pasa en otras enfermedades?** También la angiogénesis se ha estudiado en varios padecimientos como la degeneración macular (causante de ceguera), en la que se aumenta el proceso angiogénico, o en el pie diabético donde se ha visto la disminución de formación de vasos sanguíneos. Además, hay enfermedades que presentan alteraciones debido al aumento o disminución, en zonas específicas, de vasos sanguíneos, como es el caso de la **diabetes**.

La diabetes *mellitus* es un **desorden metabólico** que se caracteriza por un aumento en la cantidad de glucosa en la sangre, generando diversas complicaciones dependiendo el nivel de avance de la enfermedad. En personas con diabetes avanzada, se pueden presentar alteraciones como retinopatía diabética, neuropatía diabética, deficiencia

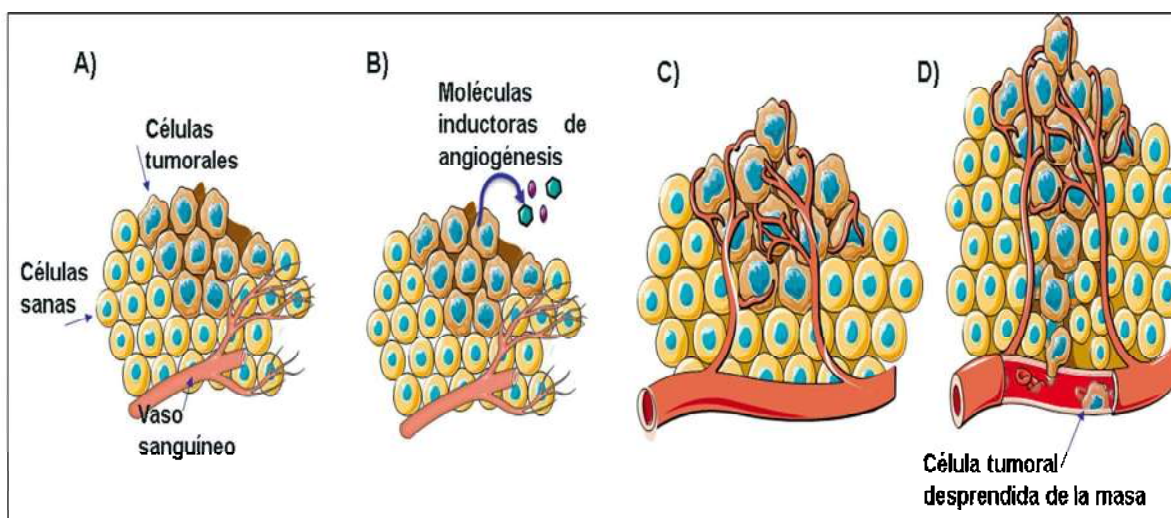
en la cicatrización, entre otras. Además, se ha visto que los embriones de **madres diabéticas** sufren anomalías en la angiogénesis y vasculogénesis, lo que se asocia a las deficiencias en la angiogénesis de la placenta, que eventualmente pueden desencadenar abortos o nacimientos prematuros.

Estos daños se ven influenciados por condiciones específicas de la formación de vasos sanguíneos. Otro de los padecimientos más frecuentes en personas diabéticas, es la formación de úlceras en los pies, culminando en amputación en el 80 % de los casos. Estas úlceras generan el conocido **"pie diabético"**, el cual se asocia a la deficiencia en la capacidad de cicatrización debido a que presentan alteración en el proceso de angiogénesis.

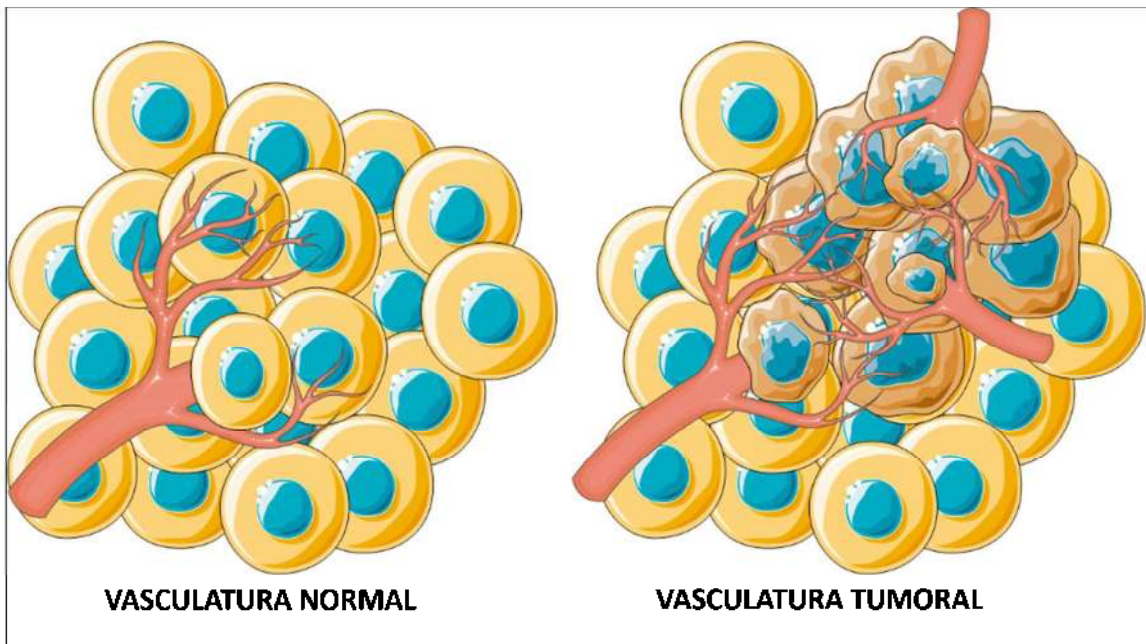
Adicionalmente, las anomalías en la angiogénesis de personas diabéticas, no permiten que sean candidatos a trasplantes, esto se debe a que, en personas sanas (no diabéticas) la **revascularización** del tejido tarda aproximadamente 10 días (variando del tipo de trasplante), mientras que en personas diabéticas, la vascularización se retarda por la ausencia de moléculas estimuladoras de la angiogénesis, lo cual puede dañar al tejido trasplantado.

### Tratamientos dirigidos hacia la angiogénesis

Hemos visto hasta aquí, la gran importancia que presenta la angiogénesis en diversos procesos patológicos, por lo que se han desarrollado algunas estrategias terapéuticas con el propósito de



Representación del crecimiento de un tumor debido a la formación de vasos sanguíneos nuevos a) Masa tumoral. b) El tumor secreta moléculas para estimular el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos. c) El tumor crece por los nutrientes que obtiene. d) Una célula se libera de la masa tumoral y viaja a través de los vasos sanguíneos formados (Modificado de Servier Medical Art)



*Representación de la vasculatura en tejidos normales y tejidos tumorales. En la vasculatura normal, todas las células tienen una oxigenación adecuada y la formación de vasos es ordenada, por el contrario, en las células tumorales (región verde, figura de la derecha) algunas presentan una mala oxigenación, lo que estimula una formación rápida y desordenada de vasos sanguíneos (Modificado de Servier Medical Art)*

**inhibirla**; por ejemplo, en la degeneración macular se usa Ranibizumab® como tratamiento principal, o para estimularla, aunque no hay medicamentos aprobados específicos para este fin. Varios grupos de investigación están probando el uso de péptidos sintéticos como IDR-1018 o PR1P, para estimular la angiogénesis en la reparación de heridas y pie diabético.

Algunos de los tratamientos que se usan actualmente con el fin de inhibirla, están enfocados principalmente contra tumores cancerosos, y se dividen en dos grupos: los que actúan contra **moléculas específicas** para la angiogénesis y los que son **inespecíficos**.

1.-Por mencionar algún ejemplo de los inespecíficos, se encuentran la Doxiciclina® y el Zolendronato®, cuya acción farmacológica es indirecta en contra de las rutas que regulan la angiogénesis.

2.-Con respecto a los específicos, los más usados actualmente son Bevacizumab®, Endostatina® y Sunitinib®. Estos tratamientos se usan de manera conjunta con quimioterapia para disminuir el crecimiento de algunos tipos de cáncer, como el colo-rectal o gastrointestinal principalmente, pues aún no se

tiene la autorización por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA, por sus siglas en inglés), para emplearlos de manera general.

Las **desventajas** del uso de este tipo de medicamentos consisten principalmente en que, si se dejan de aplicar incluso por breves periodos de tiempo, surgen de nueva cuenta más vasos sanguíneos que irrigan al tumor, aunado con el alto costo de este tipo de tratamientos y a los efectos adversos como cardiotoxicidad, hipertensión o hemorragias.

### **Péptidos antimicrobianos como alternativa para regular la angiogénesis**

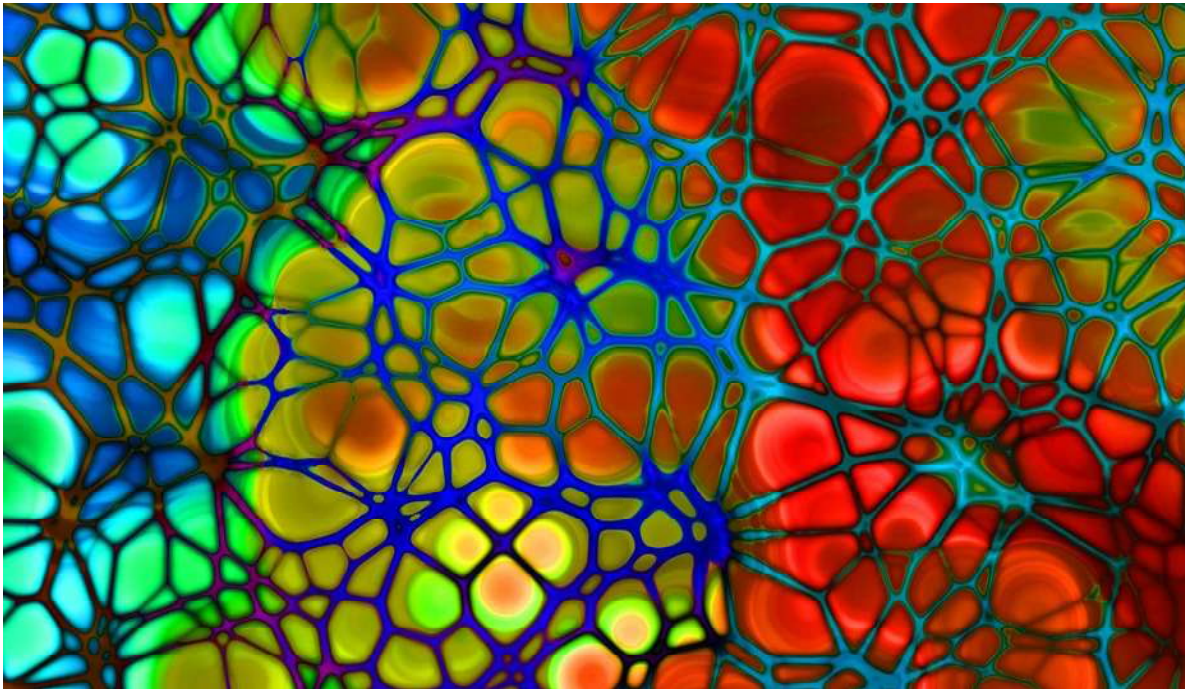
Otros grupos de investigación se han centrado en la búsqueda de nuevas terapias alternativas que ayuden a regular la angiogénesis, usando moléculas menos tóxicas con el organismo y provenientes de fuentes naturales, como son los **péptidos antimicrobianos**. Éstos son moléculas pequeñas a los que inicialmente se les atribuyó una capacidad para combatir patógenos y son producidos prácticamente por todos los organismos. Sin embargo, en años recientes se ha visto que presentan actividades muy diversas como influenciar al sistema inmune, e incluso, alterar la angiogénesis, aunque

hasta ahora no existe ningún péptido aprobado para ese fin.

La búsqueda de péptidos antimicrobianos con este tipo de actividades, parece ser una **buena propuesta como tratamiento** contra la angiogénesis generada en los tumores cancerosos; se ha encontrado que algunos péptidos provenientes de plantas, ranas, bovinos, e incluso insectos, presentan **propiedades anticancerosas**. Sin embargo, aún falta desarrollar más estudios al respecto que sustenten que estas pequeñas moléculas, presentan más beneficios que los tratamientos farmacológicos generados por química sintética que se emplean actualmente.

### El reto para regular el proceso de la angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fisiológico normal y necesario en el desarrollo de los organismos; sin embargo, cuando no es regulado correctamente, puede beneficiar procesos patológicos como el cáncer o enfermedades crónico-degenerativas. El emplear a la angiogénesis como un blanco terapéutico en estos padecimientos, representa un gran reto, ya que se puede alterar también la angiogénesis fisiológica. Por lo anterior, resulta necesario continuar con la investigación sobre los mecanismos moleculares y celulares que subyacen en este proceso, para que, en un futuro, se pueda modificar de manera regulada.



Inhibidores de la angiogénesis. Instituto Nacional de Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-inhibidores-angiogenesis>

Mentzer, S.J. y Konerding M.A. (2014). Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*, 17(3):499-509. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4063884/pdf/nihms-579404.pdf>

Saavedra Torres J.S., Zúñiga Cerón L.F., Freyre Bernal

S.I., Muñoz Ordoñez G.W. y Salguero C. (2017). El rol de VEGF en la Angiogénesis fisiológica y tumoral. *Medicina*, 39(3):190-209. <https://revistamedicina.net/ojsanm/index.php/Medicina/article/view/118-3>

Sánchez Socarrás, V. (2001). Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(3):223-230. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v20n3/ibi10301.pdf>

## VIII. Discusión general

La angiogénesis hace referencia al crecimiento de vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, está involucrada en procesos fisiológicos como la reparación de heridas, el desarrollo del embarazo, la menstruación o en el mantenimiento de los tejidos. Para que este proceso se lleve a cabo de una manera eficiente debe estar regulado por moléculas pro angiogénicas y anti angiogénicas (Folkman, 2006). Por lo cual se ha propuesto que la regulación de la angiogénesis puede beneficiar en el control de algunas patologías inflamatorias, como lo pueden ser la artritis reumatoide, psoriasis, retinopatía o el crecimiento de tumores (Medina Torres, 2017).

Dentro de las múltiples opciones de tratamientos para regular la angiogénesis, se han aprobado pocos esquemas enfocados a inhibir la actividad del VEGF en terapias anticancerosas (Melincovici et al., 2018). De manera alternativa se ha propuesto el uso de péptidos antimicrobianos derivados de plantas para regular el proceso angiogénico, específicamente las defensinas, ya que estas presentan características estructurales similares a las defensinas de mamíferos.

En el grupo de se ha trabajado con 2 defensinas provenientes de plantas que presentaron propiedades citotóxicas contra células cancerosas al usar concentraciones micromolares (Guzman-Rodríguez et al., 2016; Jiménez-Alcantar et al., 2022; Flores-Alvarez investigación et al., 2023). Estas son PaDef, proveniente del aguacate nativo mexicano *P. americana* var. *drymifolia*, y  $\gamma$ -tionina proveniente del chile habanero *C. chinense*. Sin embargo, solo se ha reportado actividad inmunomoduladora para  $\gamma$ -tionina en células de epitelio mamario bovino (Diaz-Murillo et al.2016), pero no para PaDef, por lo que en este trabajo se evaluó la capacidad inmunomoduladora de estas dos defensinas, enfocándose en la regulación de la actividad de VEGF para estimular la angiogénesis.

Se usaron dos líneas celulares endoteliales provenientes de dos organismos, las BUVEC (de vena de cordón umbilical bovino) y EA.hy926 (provenientes de la

fusión de venas de cordón umbilical humano con la línea A549 de cáncer de pulmón). Ambas líneas mantienen características de las células endoteliales y responden positivamente a estímulos angiogénicos (Cajero-Juárez et al., 2002; Kokai et al., 2022), por lo que son un buen modelo para probar si los péptidos PaDef y  $\gamma$ -tionina ejercen funciones regulatorias sobre células endoteliales. El uso del VEGF en los experimentos nos sirve como control positivo de estimulación, puesto que este factor de crecimiento induce procesos como proliferación, migración, formación de tubos y activación endotelial (Ferrara et al., 2003). El estímulo generado por el VEGF sobre las células humanas EA.hy926 y sobre bovinas BUVEC, demostró que ambas líneas celulares responden positivamente a dicho factor de crecimiento.

Debido a que en el presente trabajo no nos interesa generar un daño a la viabilidad celular, se probaron diferentes concentraciones en el orden de los nanogramos por mililitro, con base en las concentraciones de los PAPs reportadas como inmunomoduladoras previamente (Boman, 2003). Primeramente, se probó el efecto citotóxico de los péptidos sobre las células endoteliales; los resultados obtenidos muestran que los péptidos PaDef y  $\gamma$ -tionina no generan daño a la viabilidad de las células BUVEC ni EA-hy926, por lo que el uso de estas concentraciones puede tener efecto en la respuesta inmunológica, tal como lo reportó Diaz-Murillo et al. (2016), donde se observó que  $\gamma$ -tionina genera un efecto inmunomodulador (100 ng/mL) sobre células de epitelio mamario bovino.

Con la finalidad de determinar si los péptidos PaDef y  $\gamma$ -tionina generan un efecto, a concentraciones inmunomoduladoras, sobre la respuesta angiogénica, se llevaron a cabo análisis para determinar si los péptidos afectan la respuesta angiogénica inducida por el VEGF. Los resultados obtenidos a lo largo del trabajo indican que los péptidos generan un efecto inhibitorio al estímulo del VEGF sobre las células endoteliales, los cuales se discuten a continuación:

Las propiedades inhibitorias de las defensinas vegetales PaDef y  $\gamma$ -tionina sobre el estímulo proliferativo, de migración y de formación de estructuras tubulares del VEGF coinciden con lo reportado anteriormente para defensinas humanas (Bian et al., 2017; Bindra et al., 2022). Como es el caso de la defensina HBD2, la cual ejerce un efecto inhibitorio en el proceso angiogénico relacionado al crecimiento de tumores (Lee et al., 2021). Adicionalmente, un péptido antimicrobiano de origen sintético, el IDR1018, mostró una actividad estimuladora de la angiogénesis en modelos de ratón (Marin-Luevano et al., 2018). Sin embargo, este trabajo representa el primer reporte del uso de defensinas de origen vegetal para la regulación de la angiogénesis en mamíferos.

Como primera etapa se probaron diferentes condiciones de interacción entre los péptidos con el VEGF y las células, ya que era necesario determinar si el orden de adición de los tratamientos influenciaba en la respuesta celular al VEGF, es decir se quería determinar si al adicionar los péptidos antes, al mismo tiempo o después que el VEGF, la respuesta de las células al factor de crecimiento se afectaba, y lo cual puede sugerir un mecanismo de interacción de las moléculas. Por lo que se evaluó la proliferación celular bajo estas diferentes condiciones de tratamiento. Los resultados indicaron que el orden de adición del tratamiento es importante para generar una respuesta en la proliferación (Capítulo I), ya que se observó que los péptidos pueden enmascarar el VEGF, disminuyendo la proliferación y migración celular inducida por el VEGF, cuando se adicionaba al mismo tiempo la mezcla VEGF-péptido o al adicionar primero el péptido (PaDef o  $\gamma$ -tionina) y posteriormente el VEGF, pero no se observó un efecto inhibición al agregar primero el VEGF y posteriormente el péptido (PaDef o  $\gamma$ -tionina). Por lo que se procedió a trabajar con la mezcla VEGF-péptido para los ensayos posteriores.

En el proceso de inducción de la angiogénesis intervienen moléculas como el factor inducible por hipoxia (HIF)-1 $\alpha$ , el cual se induce bajo estímulos como el

generado por VEGF en algunas condiciones (Frantz et al., 2005). Por ello, se evaluó el efecto de la hipoxia química en la interferencia generada por los péptidos sobre la proliferación inducida por el VEGF. Los resultados señalan que no se afectó la estimulación de la proliferación en las células BUVEC por el VEGF al ser tratadas con los péptidos y estar inducida la hipoxia. Esto se podría explicar tomando en cuenta el mecanismo de HIF-1 $\alpha$ , en el cual se activan las vías de Erk 1/ 2 y AKT para promover la proliferación y migración de células endoteliales (Movafagh et al. 2015; Patan, 2000), o la activación de otros péptidos como la angiotensina II para estimular el proceso proliferativo en ambientes de hipoxia, como lo menciona Movafagh et al. 2015. Sin embargo, esto requiere futura investigación. Asimismo, en las células EA.hy926 el tratamiento VEGF-péptido en combinación con la hipoxia química, evitó que los péptidos inhibieran la estimulación del VEGF sobre la proliferación, aunque de manera discreta. Estos datos demostraron que los péptidos poseen una actividad diferencial, dependiendo del origen de las células.

Dentro de los procesos involucrados en la angiogénesis, además de la proliferación, estimulados por el VEGF se encuentra la migración y la formación de estructuras tubulares (Carmeliet, 2000). En este sentido, PaDef y  $\gamma$ -tionina afectaron la migración celular estimulada por el VEGF, tanto en las células bovinas como en las humanas, pero por si solos, ninguno de los péptidos generó un efecto en las células. Esta respuesta es contraria a lo que se reporta para otros péptidos, como el sintético IDR1018, el cual solo estimula la migración celular (Mansour et al., 2015; Marin-Luevano et al., 2018). Por otro lado, la quimiotaxis, que es un evento relacionado con la migración, se evaluó en ambos tipos celulares. Se observó que ni PaDef ni  $\gamma$ -tionina atraían a las células endoteliales a través de una membrana, e incluso se observó una disminución en la migración de las células BUVEC en los tratamientos con  $\gamma$ -tionina. Estos resultados difieren de lo reportado para otras defensinas, como la HBD2, la cual por sí sola favorece la quimiotaxis de células endoteliales dependiendo de la concentración, teniendo una respuesta estimuladora

a partir de los 500 ng/mL (Baroni et al., 2019). Por lo que, se concluyó que los péptidos evitan que el VEGF genere el estímulo de atracción sobre las células.

Las células endoteliales también son capaces de atraer otras células (polimorfonucleares) mediante la producción de IL-8 (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005; Jiménez-Andrade & González-Espinosa, 2011). Por ello, se determinó la producción de IL-8 e IL-6 en el medio de las células endoteliales EA.hy926, y células BUVEC mediante un kit de CBAs para uso de muestras de origen humano. Sin embargo, estas moléculas no fueron detectadas en los sobrenadantes de las BUVEC tratadas, lo cual se podría explicar debido a que el kit usado es específico para humanos, pero también podría deberse a que la respuesta de las BUVEC presenta ciertas diferencias a la respuesta de las células humanas, como se probó en trabajos previos (Falcón-Ruiz, et al. 2023) y no presentan suficiente producción de las moléculas analizadas para su detección mediante este kit. Por otro lado los resultados obtenidos por análisis de los sobrenadantes de las células EA.hy926 mostraron que hubo una disminución en la producción de estas citocinas en la línea humana cuando se trataron a las células con los péptidos solos, pero un aumento en la producción de ambas al ser tratadas con las combinaciones de VEGF-péptido. Estos resultados sugieren que las células endoteliales al ser tratadas con las mezclas, no están siendo estimuladas para generar angiogénesis, sino que más bien, la activación puede orientarse al proceso inflamatorio (Lee et al., 2021). Los efectos sobre la activación endotelial inducida por un estímulo inflamatorio, donde se ve aumentada la producción de IL-8 han sido discutidos en trabajos previos. Cooper et al. (1996) relaciona la participación de otras moléculas activadoras como E-selectina y el factor tisular con el aumento de IL-8 en la activación de la respuesta inflamatoria. Lo cual podría dar una posible explicación a la respuesta inducida por la combinación VEGF-péptido sobre las células EA.hy926.

La baja producción de IL-8 en los tratamientos con los péptidos solos podría explicar los resultados de adherencia de las células PMN al endotelio, ya que se

observó que el número de células PMN adheridas a las células endoteliales no aumentó en los tratamientos con los péptidos. Sin embargo, el aumento de la secreción de IL-8 en los tratamientos con la mezcla VEGF-péptido podría explicar el aumento en la adhesión de los PMN a las células endoteliales comparadas con el VEGF, ya que es conocido que la IL-8 juega un papel importante en el reclutamiento de células del sistema inmune en un proceso inflamatorio (Lee et al., 2021)

De la misma manera, otros procesos evaluados, como la formación de estructuras tubulares, permitieron determinar que los péptidos están interfiriendo con el efecto estimulador del VEGF. Si bien la formación de tubos no se inhibió por completo en las células EA.hy926 al ser tratadas con los péptidos, se observó que disminuyó el número de estructuras formadas cuando se trataron con la mezcla de VEGF-péptido. Esto se relaciona con los resultados obtenidos en la expresión de genes, ya que de manera interesante se observó un aumento en la expresión de *VEGFA7* (anti-angiogénico) y *E-selectina* en el tratamiento con PaDef. De nueva cuenta, los efectos encontrados con el uso de estas defensinas, difieren de lo reportado para la defensina HBD2 que se ha visto que favorece la formación de tubos en matrigel (Baroni et al., 2009). Desafortunadamente, la formación de tubos no se pudo estimular en las células bovinas, razón por la cual, los ensayos para evaluar la activación celular solo se realizaron con las células EA.hy926.

Debido a los resultados obtenidos con las células EA.hy926, con respecto a la adherencia de células PMN y la formación de tubos, se determinó si el efecto de los péptidos también involucraba la capacidad de las células endoteliales para mantenerse adheridas a una matriz alta en proteínas. Por lo que se realizó el ensayo de adherencia sobre matrigel, la cual permitió determinar de una manera indirecta la expresión de proteínas de adhesión y la activación endotelial. Los resultados demostraron que solo  $\gamma$ -tionina indujo la adherencia celular hasta en un 20% con respecto al control, lo cual sugiere que se está estimulando la expresión de

proteínas como VCAM e ICAM, e incluso podrían estarse inhibiendo actividades enzimáticas de las metaloproteasas, ya que estas son cruciales en la degradación de la matriz extracelular en la angiogénesis (Risau, 1997). Para poder determinar si este efecto se atribuye a la inactivación de las metaloproteasas, se podrían realizar ensayos de actividad enzimática, determinando la actividad de las MMP-2, MMP-7 y MMP-9, las cuales tienen una participación relevante en la degradación de la matriz extracelular (Claire-Viallard and Bruno Lariveé, 2017). Aunado a lo anterior, se debe determinar la presencia de VCAM e ICAM mediante ensayos de Western blot. Sin embargo, PaDef no afectó la adherencia celular. Estos resultados sugieren que los péptidos probados en este trabajo, a pesar de compartir características estructurales similares, difieren en la respuesta que inducen sobre las células.

Por otro lado, el tratamiento con el VEGF disminuyó la cantidad de células adheridas, lo cual corroboró que el VEGF está efectuando un estímulo angiogénico, ya que un punto clave en la estimulación de la angiogénesis es el desprendimiento de las células endoteliales de la matriz extracelular (Chowdhury et al., 2017; Viallard & Larriveé, 2017). De manera interesante, la mezcla VEGF- $\gamma$ -tionina no generó un aumento en la adhesión celular, lo que sugiere que el VEGF está interactuando con  $\gamma$ -tionina, evitando así que el VEGF lleve a cabo su actividad. Por otro lado, el tratamiento VEGF-PaDef aumentó ligeramente la adhesión celular, este resultado sugiere que la posible interacción entre PaDef y VEGF podría ser inductora de mecanismos relacionados con la inhibición del proceso angiogénico; sin embargo, hacen falta más estudios para determinarlo, como la evaluación de la actividad de metaloproteasas bajo estos estímulos.

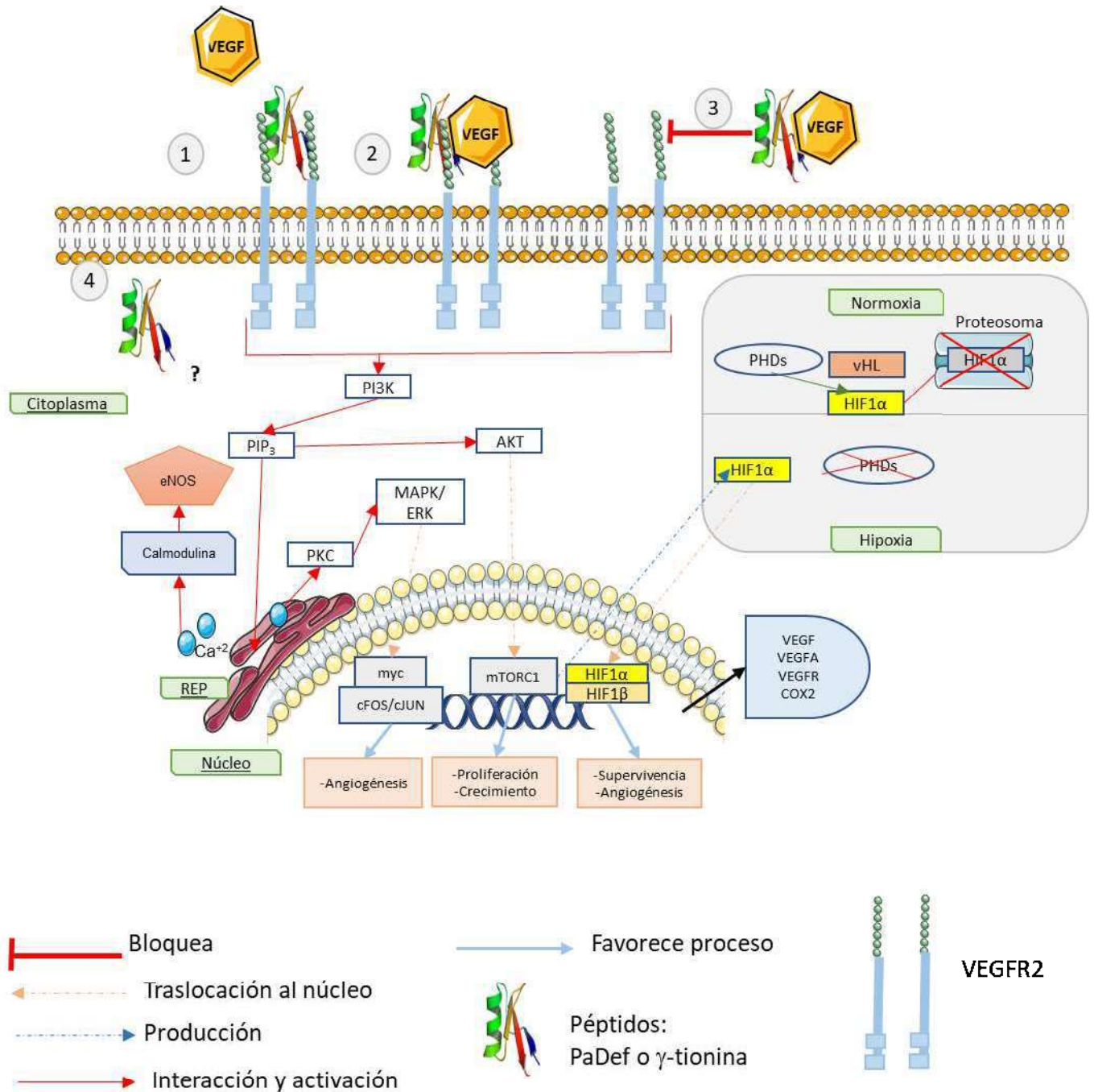
Debido a que la producción de especies reactivas de nitrógeno se asocia a un proceso de activación endotelial relacionado con la inflamación (Szade et al., 2015), se determinaron los niveles de producción de nitritos en los sobrenadantes de las células EA.hy926 tratadas. Los resultados señalan que no hay un aumento o disminución en la producción de estas especies comparadas con las células no

tratadas. El no observar variaciones de estas especies, incluso con el VEGF, indica que la activación que se pudiera estar llevando a cabo no genera una respuesta inflamatoria exacerbada (Szade et al., 2015). Estos resultados se relacionan con los niveles de expresión del gen *eNOS*, pues no se observaron variaciones en la expresión del mensajero. Estos resultados en conjunto sugieren que la activación generada bajo los tratamientos de las mezclas VEGF-péptido van orientados al proceso inflamatorio, y no a la respuesta angiogénica (Lee et al., 2021), por lo que para confirmar esto se pueden realizar ensayos de ELISA con los sobrenadantes de las células tratadas a diferentes tiempos de estimulación y adicionalmente hacer ensayos de activación enzimática para determinar la actividad de algunas metaloproteasas involucradas en este proceso y finalmente determinar las especies reactivas de oxígeno producidas bajo el estímulo de los tratamientos con los péptidos.

En la búsqueda de una posible explicación de los resultados obtenidos se propone que los péptidos PaDef y  $\gamma$ -tionina pueden interaccionar directamente con la molécula de VEGF y con ello interferir con la actividad de este factor de crecimiento. Por ello, se realizaron ensayos de docking donde se exploró la posible interacción del VEGF con los péptidos y adicionalmente con el receptor VEGFR2, (principal receptor para el estímulo de la angiogénesis) (Martínez-Ezquerro & Herrera, 2006). En los análisis de docking se busca la energía de afinidad entre las posibles interacciones entre moléculas, mientras más negativa sea la energía encontrada, más probable es la interacción. Los valores encontrados de interacción del VEGFR2 con PaDef y  $\gamma$ -tionina fueron más negativos (-11,4 y -10,5 kcal/mol) que los reportados para VEGFA (-8,9 kcal/mol) (Brozzo et al., 2012), que es el ligando natural. Estos resultados indican que los péptidos tienen una alta probabilidad de interferir con la unión del VEGF con su receptor VEGFR2, y así generar la inhibición de las funciones angiogénicas. Adicionalmente, se analizó la interacción del VEGF y los péptidos, obteniendo también energías de interacción

negativa (-15.2 kcal/mol para PaDef-VEGF y -13.3 kcal/mol para  $\gamma$ -tionina-VEGF), lo que indica que la interacción es altamente probable y espontánea. Esto podría probarse al llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación del complejo VEGF-péptido. Otros trabajos han demostrado que algunos péptidos poseen la capacidad de interactuar con VEGF e inhibir su actividad. Tal como el péptido KV11 (derivado de la apolipoproteína) que inhibe la migración y la formación de estructuras tubulares (Yi & Cho, 2008). Asimismo, los ciclopéptidos PF1171A y PF1171C (aislados del hongo *Penicillium sp.*) bloquean la actividad del VEGF relacionada con la migración de las células HUVEC (Xie et al., 2020).

Los resultados de este trabajo demuestran que los péptidos PaDef y  $\gamma$ -tionina están interfiriendo con el VEGF, evitando que este factor lleve a cabo su acción, ya sea por interferencia directa con el VEGF o con el receptor VEGFR2 (Figura 7). Además, los datos sugieren que los péptidos podrían penetrar la célula y alterar algún proceso metabólico, no necesariamente vinculado a la vía de VEGF-VEGFR2. Sin embargo, a pesar de tener respuestas similares con los 2 péptidos en la interacción con el VEGF en los dos tipos celulares, existen algunas diferencias en las respuestas observadas que sugieren que los péptidos pueden actuar a diferentes niveles. Para ello, es necesario realizar otras aproximaciones experimentales.



**Figura 7. Modelo de la interacción de los péptidos PaDef y  $\gamma$ -tionina en la vía de VEGF-VEGFR2 en células endoteliales.** Se muestra la vía activada mediante la estimulación del VEGFR2 y las posibles interacciones de los péptidos con el VEGF o el VEGFR2. 1) El péptido (PaDef o  $\gamma$ -tionina) interactúa directamente con el VEGFR2 evitando que el ligando natural VEGF se acople al receptor. 2) Existe una interacción tripartita entre el VEGF-péptido-VEGFR2, afectando la eficiencia de la estimulación río abajo. 3) El VEGF interactúa con el péptido (PaDef o  $\gamma$ -tionina) generando que

este no se acople al receptor VEGFR2, por lo cual no se activa la vía. 4) PaDef o  $\gamma$ -tionina se internalizan en la célula e interactúan con algún componente (no determinado) de la vía de VEGFR2-VEGF, afectando los procesos finales asociados a ésta. Estas interacciones resultan en la activación de la vía de una manera ineficiente, o en la inhibición de la misma, reflejándose en los procesos finales asociados como lo son la proliferación o la supervivencia celular, y la angiogénesis. REP: Retículo endoplásmico. HIF: Factor inducible de hipoxia. MAPK: proteína cinasa de activación por mitógenos. PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa. PIP<sub>3</sub>: Fosfatidil inositol trifosfato. AKT: serina/treonina proteínas cinasas. PKC: Proteína cinasa C. PHD: Prolil hidrolasa. eNOS: Oxido nítrico sintasa endotelial.

Finalmente, derivado de los objetivos de este trabajo se realizó la estandarización de un nuevo método de evaluación para la interacción célula-célula a través de la citometría de flujo (capítulo III). Debido a los controles usados en la validación del método, los resultados obtenidos en el ensayo con los diferentes tratamientos son confiables. Además, que al realizar la validación se comparó con un método de microscopía por fluorescencia usado para este tipo de determinaciones. El uso de citometría de flujo permite cuantificar las células adheridas al endotelio de manera directa y sin depender de la intensidad de fluorescencia presente en el método de microscopía, el cual se puede afectar por diversos factores físicos. Al desarrollar este nuevo método, pudimos determinar cómo los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación, reflejan el proceso de activación endotelial, viendo el efecto final relacionado a la inflamación. Por otro lado, otra de las ventajas del método propuesto, es que permite analizar no solamente la interacción de los tipos celulares propuestos en el trabajo, sino que, se pueden analizar interacciones con diversos tipos celulares de una manera cuantitativa.

## **IX. Conclusión general**

Las defensinas PaDef y  $\gamma$ -tionina a concentraciones inmunomoduladoras, afectan la inducción angiogénica del VEGF, disminuyendo la actividad de dicho factor de crecimiento sobre la estimulación de la proliferación, migración y formación de tubos de células endoteliales, además de favorecer la activación predominantemente inflamatoria.

## **X. Perspectivas y recomendaciones**

El presente trabajo contribuye al estudio del uso de péptidos provenientes de origen vegetal como terapia alternativa en diversas patologías. En base a los resultados obtenidos se propone continuar con el trabajo de la siguiente manera:

1. Determinar alteraciones en la vía del factor transcripcional HIF-1 $\alpha$  bajo la condición de hipoxia.
2. Realizar ensayos de inmunoprecipitación para comprobar la posible interacción entre los péptidos con el VEGF o el VEGFR2.
3. Probar péptidos derivados de PaDef y  $\gamma$ -tionina para determinar la región responsable de la actividad reportada en este trabajo.
4. Determinar el efecto de los péptidos en combinación con los medicamentos aprobados para inhibir la acción del VEGF, tales como la Avastatina <sup>(TM)</sup>, para determinar una posible sinergia.

## XI. Referencias

1. Baroni, A., Donnarumma, G., Paoletti, I., Longanesi-Cattani, I., Bifulco, K., Tufano, M. A., & Carriero, M. V. (2009). Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Peptides*, 30(2), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.11.001>
2. Bian, T., Li, H., Zhou, Q., Ni, C., Zhang, Y., & Yan, F. (2017). Human  $\beta$ -Defensin 3 Reduces TNF- $\alpha$ -Induced Inflammation and Monocyte Adhesion in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8529542>
3. Bindra, G. K., Williams, S. A., Lay, F. T., Baxter, A. A., Poon, I. K. H., Hulett, M. D., & Phan, T. K. (2022). Human  $\beta$ -Defensin 2 (HBD-2) Displays Oncolytic Activity but Does Not Affect Tumour Cell Migration. *Biomolecules*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/biom12020264>
4. Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 254(3), 197–215. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x>
5. Brozzo, M. S., Bjelić, S., Kisko, K., Schleier, T., Leppänen, V. M., Alitalo, K., Winkler, F. K., & Ballmer-Hofer, K. (2012). Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. *Blood*, 119(7), 1781–1788. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390922>
6. Cajero-Juárez, M., Avila, B., Ochoa, A., Garrido-Guerrero, E., Varela-Echavarría, A., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2002). Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: A model for the study of vascular endothelium. *European Journal of Cell Biology*, 81(1), 1–8. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00213>

7. Carmeliet, P. (2000). Angiogenesis in health and disease. *General Pharmacology: Vascular System*, 35(5), 225–226. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(01\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(01)00111-2)
8. Cesarman-Maus, G., & Hajjar, K. A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*, 129(3), 307–321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x>
9. Chang, J. C. (2022). Molecular Pathogenesis of Endotheliopathy and Endotheliopathic Syndromes, Leading to Inflammation and Microthrombosis, and Various Hemostatic Clinical Phenotypes Based on “Two-Activation Theory of the Endothelium” and “Two-Path Unifying Theory” of Hemostasis. *Medicina (Lithuania)*, 58(9). <https://doi.org/10.3390/medicina58091311>
10. Chowdhury, A., Nandy, S. K., Sarkar, J., Chakraborti, T., & Chakraborti, S. (2017). Inhibition of pro-/active MMP-2 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking studies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 427(1–2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2903-y>
11. Chung, A. S., & Ferrara, N. (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 563–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154002>
12. Cooper, J. T., Stroka, D. M., Brostjan, C., Palmetshofer, A., Bach, F. H., & Ferran, C. (1996). A20 blocks endothelial cell activation through a NF- $\kappa$ B-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 18068–18073. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.18068>
13. Díaz-Murillo, V., Medina-Estrada, I., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2016). Defensin  $\gamma$ -thionin from *Capsicum chinense* has immunomodulatory effects on bovine mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *Peptides*, 78, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.02.008>

14. Donnarumma, G., Paoletti, I., Fusco, A., Perfetto, B., Buommino, E., Gregorio, V. De, & Baroni, A. (2016).  $\beta$ -Defensins: Work in Progress. February, 59–76. <https://doi.org/10.1007/5584>
15. Elshabrawy, H. A., Chen, Z., Volin, M. V, Ravella, S., Shahrara, S., Medicine, O., & Grove, D. (2016). The Pathogenic Role of Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. 18(4), 433–448. <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9477-2>.
16. Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669–676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>
17. Flores-Alvarez, L. J., Jiménez-Alcántar, P., Ochoa-zarzosa, A., & Joel, E. L. (2023). The Antimicrobial Peptide and  $\gamma$ -Thionin from Habanero Chile. *Molecules*, 28. <https://doi.org/10.3390/molecules28093661>
18. Folkman, J. (2006). Antiangiogenesis in cancer therapy - Endostatin and its mechanisms of action. *Experimental Cell Research*, 312(5), 594–607. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.015>
19. Frantz, S., Vincent, K. A., Feron, O., & Kelly, R. A. (2005). Innate immunity and angiogenesis. *Circulation Research*, 96(1), 15–26. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000153188.68898.ac>
20. Ganz, T. (2003). Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710–720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
21. Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2016). The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 82, 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.048>
22. Guzmán-Rodríguez, J. J., Ochoa-Zarzosa, A., López-Gómez, R., & López-Meza, J. E. (2015). Plant antimicrobial peptides as potential anticancer

- agents. *BioMed Research International*, 2015(1).  
<https://doi.org/10.1155/2015/735087>
23. Guzmán Rodríguez, J. J. (2016). Citotoxicidad de las Defensinas PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*) y  $\gamma$ -tionina (*Capsicum chinense*) Contra la Línea Celular de Cáncer de Mama MCF-7 (Vol. 1) [Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo].
24. Jay B. Fox, J. (1979). Kinetics and Mechanisms of the Reduction. *Analytical Chemistry*, 51(9), 1493–1502.
25. Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
26. Jiménez-Alcántar, P., López-Gómez, R., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2022). PaDef (*Persea americana* var. *drymifolia*), a Plant Antimicrobial Peptide, Triggers Apoptosis, and Induces Global Epigenetic Modifications on Histone 3 in an Acute Lymphoid Leukemia Cell Line. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9(January), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.801816>
27. Jiménez-Andrade, G. Y., & González-Espinosa, C. (2011). Inflamación y angiogénesis: el papel facilitador de las células cebadas en el desarrollo del melanoma. *El Residente*, 6(2), 111–119.
28. Kawsar, H. I., Ghosh, S. K., Hirsch, S. A., Koon, H. B., Weinberg, A., & Jin, G. (2010). Expression of human  $\beta$ -defensin-2 in intratumoral vascular endothelium and in endothelial cells induced by transforming growth factor  $\beta$ . *Peptides*, 31(2), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.12.008>
29. Kokai, D., Stanic, B., Tesic, B., Samard, D., Pogrmic-majkic, K., Fa, S., & Andric, N. (2022). Dibutyl phthalate promotes angiogenesis in EA . hy926 cells through estrogen receptor-dependent activation of pathways. *Chemo-*

30. Lee, H. J., Hong, Y. J., & Kim, M. (2021). Angiogenesis in chronic inflammatory skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222112035>
31. Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. (2017). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review). In *Oncology* (Vol. 16, pp. 687–702). <https://doi.org/10.3892/ol.2018.87330>
32. Mansour, S. C., De La Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2015). Peptide IDR-1018: Modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Peptide Science*, 21(5), 323–329. <https://doi.org/10.1002/psc.2708>
33. Marin-Luevano, P., Trujillo, V., Rodríguez-Carlos, A., González-Curiel, I., Enciso-Moreno, J. A., Hancock, R. E. W., & Rivas-Santiago, B. (2018). Induction by innate defence regulator peptide 1018 of pro-angiogenic molecules and endothelial cell migration in a high glucose environment. *Peptides*, 101(November 2017), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.01.010>
34. Martin, A., Komada, M. R., & Sane, D. C. (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 117–145. <https://doi.org/10.1002/med.10024>
35. Martínez-Ezquerro, J. D., & Herrera, L. A. (2006). ANGIOGÉNESIS: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer. *Cancerología*, 1, 83–96.
36. Medina Torres, M. (2017). Enfermedades raras con angiogénesis desregulada. *Encuentros En La Biología*, 10(162), 220–222.
37. Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mihu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L., & Mihu, C. M. (2018). Vascular endothelial

- growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59(2), 455–467.
38. Movafagh, S., Crook, S., & Vo, K. (2015). Regulation of hypoxia-inducible Factor-1a by reactive oxygen species: New developments in an old debate. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(5), 696–703. <https://doi.org/10.1002/jcb.25074>
39. Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, 59(3), 181–196. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>
40. Patan, S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of Neuro-Oncology*, 50(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1023/A:1006493130855>
41. Patel, S., & Akhtar, N. (2017). Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential ‘offense and defense’ molecules are more than antimicrobials. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 95(July), 1276–1283. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.042>
42. Pober, J. S. (2002). Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Research*, 4, S109–S116. <https://doi.org/10.1186/ar576>
43. Ponnoth, D. S., & Jamal Mustafa, S. (2011). Adenosine receptors and vascular inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(5), 1429–1434. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.08.024>
44. Ramjiawan, R. R., Griffioen, A. W., & Duda, D. G. (2017). Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? *Angiogenesis*, 20(2), 185–204. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9552-y>
45. Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. In *Nature* (Vol. 386, Issue 6626, pp. 671–674). <https://doi.org/10.1038/386671a0>
46. Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R., & Tsutsumi, V. (2006). Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades

- infecciosas. *Salud Publica de Mexico*, 48(1), 62–71.  
<https://doi.org/10.1590/s0036-36342006000100010>
47. Streit, M., & Detmar, M. (2003). Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene*, 22(20), 3172–3179.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206457>
48. Szade, A., Grochot-Przeczek, A., Florczyk, U., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2015). Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life*, 67(3), 145–159. <https://doi.org/10.1002/iub.1358>
49. Trujillo, V., Marín-Luevano, P., González-Curiel, I., Rodríguez-Carlos, A., Ramírez-Reyes, M., Layseca-Espinosa, E., Enciso-Moreno, J. A., Díaz, L., & Rivas-Santiago, B. (2017). Calcitriol promotes proangiogenic molecules in keratinocytes in a diabetic foot ulcer model. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 174(July), 303–311.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.10.013>
50. Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409–426.  
<https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>
51. Wang, C. G., Lou, Y. T., Tong, M. J., Zhang, L. L., Zhang, Z. J., Feng, Y. Z., Li, S., Xu, H. Z., & Mao, C. (2018). *Asperosaponin VI* promotes angiogenesis and accelerates wound healing in rats via up-regulating HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(3), 393–404.  
<https://doi.org/10.1038/aps.2017.161>
52. Witmer, A. N., Van Blijswijk, B. C., Dai, J., Hofman, P., Partanen, T. A., Vrensen, G. F. J. M., & Schlingemann, R. O. (2001). VEGFR-3 in adult angiogenesis. *Journal of Pathology*, 195(4), 490–497.  
<https://doi.org/10.1002/path.969>

53. Xie, M., Liu, D., & Yang, Y. (2020). Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open Biology*, 10(7). <https://doi.org/10.1098/rsob.200004>
54. Yi, Z.-F., & Cho, S.-G. (2008). A Novel Peptide from Human Apolipoprotein(a) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth by Targeting c-Src Phosphorylation in VEGF-induced Human Umbilical Endothelial Cells. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/ijc.24027.A>