



ARTÍCULO DE REVISIÓN

El kininógeno de alto peso molecular: su participación en la respuesta inflamatoria y en la angiogénesis. Propiedades y posible aplicación terapéutica

Irma Isordia-Salas,* Irma M. Sainz,* Robin A. Pixley,* Carlos Martínez-Murillo,** Robert W. Colman*

* The Sol Sherry Thrombosis Research Center, Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA. USA 19140.

** Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

High molecular weight kininogen in inflammation and angiogenesis: a review of its properties and therapeutic applications

RESUMEN

ABSTRACT

The plasma kallikrein-kinin system (KKS) participates in the pathogenesis of inflammatory reactions involved in cellular injury, coagulation, fibrinolysis, kinin formation, complement activation, cytokine secretion and release of proteases. It has been shown that KKS activation in the systemic inflammatory response syndrome results in decrease of its component plasma proteins. Similar changes have been documented in diabetes, sepsis, children with vasculitis, allograft rejection, disseminated intravascular coagulation, patients with recurrent pregnancy losses, hereditary angioedema, adult respiratory distress syndrome and coronary artery disease. Direct involvement of the KKS in the pathogenesis of experimental acute arthritis and acute and chronic enterocolitis has been documented by previous studies from our laboratory using experimental animal models. It has been found that in HK deficient Lewis rats, experimental IBD was much less severe. We showed a genetic difference in kininogen structure between resistant Buffalo and susceptible Lewis rats, which results in accelerated cleavage of HK and it is responsible for the susceptibility to the inflammatory process in the Lewis rats. It has been demonstrated that therapy with a specific plasma kallikrein inhibitor (P8720) modulated the experimental enterocolitis, arthritis and systemic inflammation. Furthermore, it has been shown that a bradykinin 2 receptor (B2R) antagonist attenuates the inflammatory changes in the same animal model. We have showed that a monoclonal antibody targeting HK decreases angiogenesis and arrests tumor growth in a syngeneic animal model. In summary, these results indicate that the plasma KKS plays a central

Se ha demostrado la participación del sistema plasmático de kalikreína-kininas (KKS) en el proceso inflamatorio, el cual incluye reacciones de daño celular, coagulación y fibrinólisis, formación de kininas, activación del complemento, secreción de citoquinas y liberación de proteasas. El KKS se encuentra activado en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con una disminución en la concentración plasmática de las proteínas que lo constituyen. También se ha demostrado una activación similar en la diabetes, choque séptico, vasculitis en infantes, enfermedad injerto-huésped, coagulación intravascular diseminada, pacientes con abortos de repetición, angioedema hereditario, el síndrome de estrés respiratorio del adulto y enfermedad coronaria arterial. Mediante el uso de modelos animales experimentales, nuestro laboratorio ha demostrado una participación directa del KKS en la patogénesis de la artritis experimental aguda y la enterocolitis aguda y crónica. Se ha demostrado que en la rata tipo Lewis, cuando es deficiente de kininógeno de alto peso molecular (HK), la enfermedad inflamatoria intestinal es menos severa comparada con la presentada en ratas con niveles normales de HK como la Buffalo. Nosotros mostramos una diferencia entre el gene que codifica la molécula del kininógeno de la rata tipo Buffalo (resistentes) y Lewis (susceptibles), que resulta en un incremento de la actividad proteolítica de kalikreína sobre su sustrato HK, lo cual predispone a las ratas Lewis al desarrollo de la enfermedad inflamatoria crónica. Se ha demostrado una disminución en las manifestaciones inflamatorias sistémicas de la enterocolitis y artritis experimental mediante el uso de un inhibidor específico de la kalikreína (P8720). Además, el antagonista del receptor 2 de la bradikina (BR2) atenuó los cambios inflamatorios en el mismo modelo animal. Asimismo, se ha demostrado que las ratas Lewis deficientes de kininógeno desarrollaron inflamación intestinal sistémica menos severa. Mediante el uso del

Key words. Angiogenesis. Chronic reactive arthritis. High molecular weight kininogen. Inflammatory bowel disease.

INTRODUCCIÓN

El sistema plasmático de kalikreína-kininas (KKS) es activado e inhibido por diversos mecanismos bioquímicos y celulares. Se ha demostrado que el KKS posee propiedades antiadhesivas, profibrinolíticas, proinflamatorias, anticoagulantes y participa en el proceso angiogénico.¹⁻⁴ Por lo tanto, el KKS desempeña un papel importante en la fisiopatología de la inflamación, la cual involucra reacciones de daño celular como son: liberación de enzimas, secreción de citoquinas, formación de kininas y activación de los sistemas de complemento, coagulación y fibrinolítico.^{5,6}

En el humano, y en algunos roedores, el KKS (Figura 1) está constituido por tres proteínas denominadas factor XII (FXII), prekalikreína (PK) y kininógeno de alto peso molecular (HK). El KKS puede ser activado mediante la exposición del subendotelio a superficies cargadas negativamente, como es la endo-

anticuerpo monoclonal C11C1 contra HK se logró una disminución de la angiogénesis y, consecuentemente, el crecimiento tumoral. En conclusión, los resultados demuestran que el sistema plasmático de KKS desempeña un papel preponderante en la patogénesis de la artritis reumatoide, la enfermedad intestinal crónica y en el proceso angiogénico.

Palabras clave. Angiogénesis. Artritis crónica reactiva. Enfermedad intestinal inflamatoria. Kininógeno de alto peso molecular.

toxina de la pared bacteriana, o por superficies orgánicas macromoleculares (heparina y otros mucopolisacáridos), produciendo la activación del factor FXII (FXIIa), el cual proteoliza a la prekalikreína y la transforma en una enzima activa denominada kalikreína. El KKS también puede ser activado sobre la superficie de la célula endotelial.⁷ La proteólisis requiere la presencia del ión cinc, así como de la unión de los factores XII y HK a las proteínas receptoras como son: citokeratina 1, el receptor del activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPARr) y al receptor de la proteína globular del subcomponente del complemento C1qR.⁷

El HK es una proteína multifuncional codificada por un solo gen,⁸ y está constituida por seis dominios (Figura 2). El HK puede ser proteolizado por diversas enzimas como son: catepsina,⁹ kalikreína y la elastasa del neutrófilo.¹⁰ En humanos y en algunas especies animales (ratas), la kalikreína plasmática proteoliza al kininógeno confiriéndole actividad, el cual es deno-

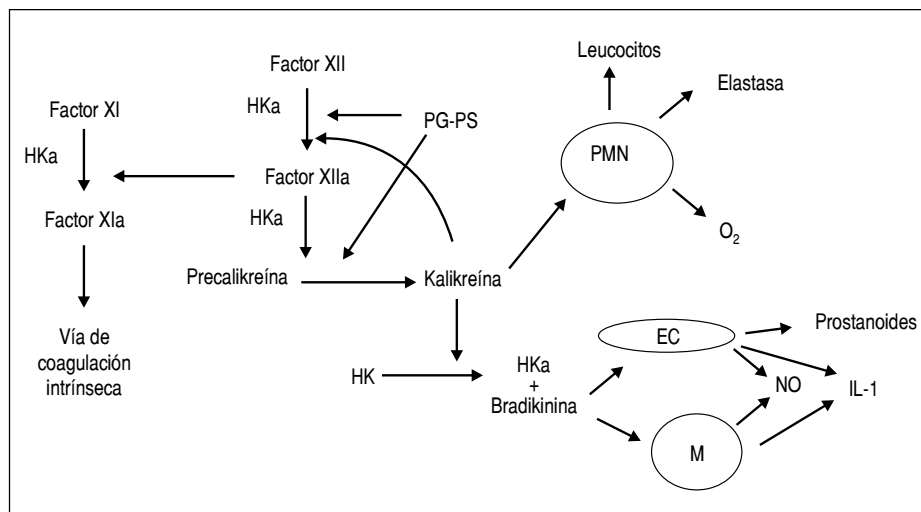


Figura 1. El mecanismo de acción del sistema plasmático de kalikreína-kininas (KKS) en el proceso inflamatorio. La activación del sistema KKS es iniciado por la acción del PG-PS mediante la proteólisis del factor XII (FXII) y la prekalikreína (PK), lo cual produce la activación del factor XII (FXIIa) y kalikreína. El FXIIa produce la molécula de kalikreína mediante la proteólisis de PK y también produce la activación el factor XI (FXIa), el cual estimula la vía intrínseca de la coagulación. La kalikreína proteoliza al kininógeno de alto peso molecular (HK) produciendo un cofactor activo denominado (HKa) y libera bradikinina (BK). A su vez, kalikreína activa a los neutrófilos (PMN) e induce liberación de elastasa y superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Estas reacciones contribuyen al proceso inflamatorio y producen daño tisular. La BK activa a las células endoteliales (EC) produciendo liberación de óxido nítrico (NO), prostanoideos e interleuquina-1 (IL-1). Asimismo, la BK estimula los monocitos (MO) e induce la secreción de NO e IL-1. Durante el proceso inflamatorio, estos mediadores producen dilatación vascular local, con un incremento en la permeabilidad del vaso, lo cual contribuye a la presencia de dolor, exudado y concentración de células inflamatorias.

tribuyen al proceso inflamatorio y producen daño tisular. La BK activa a las células endoteliales (EC) produciendo liberación de óxido nítrico (NO), prostanoideos e interleuquina-1 (IL-1). Asimismo, la BK estimula los monocitos (MO) e induce la secreción de NO e IL-1. Durante el proceso inflamatorio, estos mediadores producen dilatación vascular local, con un incremento en la permeabilidad del vaso, lo cual contribuye a la presencia de dolor, exudado y concentración de células inflamatorias.

minado HKa. Este proceso proteolítico es llevado a cabo en tres pasos secuenciales, los cuales incluyen los sitios donde se lleva a cabo la proteólisis (Figura 3). Durante el primer paso, se produce una proteína

intermedia constituida por dos cadenas (una pesada y una ligera) unidas por un puente disulfuro. La denominada cadena pesada del kininógeno tiene un peso molecular de 64 kilodaltones (kDa), comprende los do-

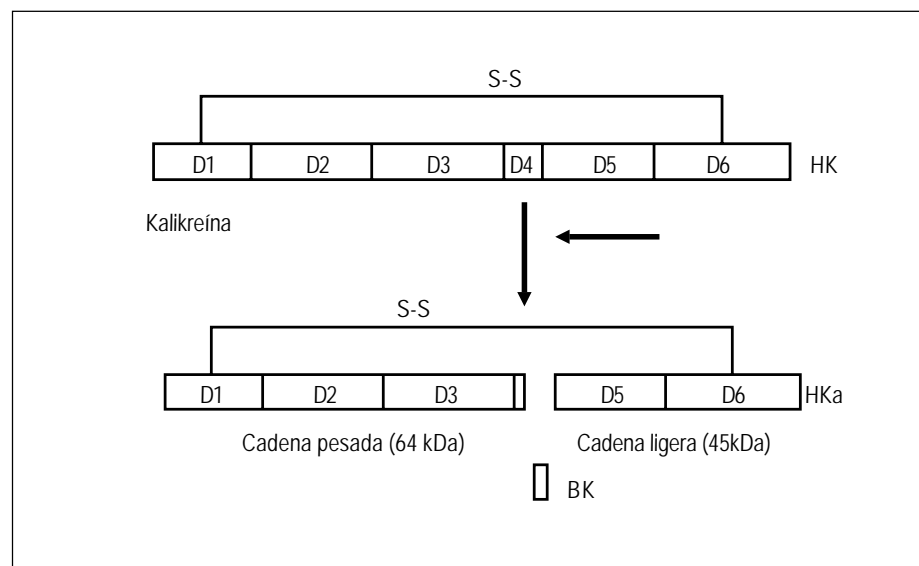


Figura 2. Estructura funcional del kininógeno de alto peso molecular. El kininógeno de alto peso molecular está dividido en seis dominios (D1-D6). El D1 se encuentra unido al D6 a través de un puente disulfuro. La kalikreína proteoliza el HK en tres sitios diferentes. La primera proteólisis convierte HK en una molécula con dos cadenas (una ligera y otra pesada). La segunda proteólisis libera BK. La tercera proteólisis estabiliza la molécula y adquiere cambios conformacionales, lo cual le confiere propiedades antiadhesivas, antiangiogénicas y profibrinolíticas. Posterior a la acción proteolítica de kalikreína sobre su sustrato HK se le denomina (HKa). El anticuerpo C11C1 se une al D5 de HK impide el acoplamiento de HK a la superficie endotelial y por consiguiente inhibe sus funciones.

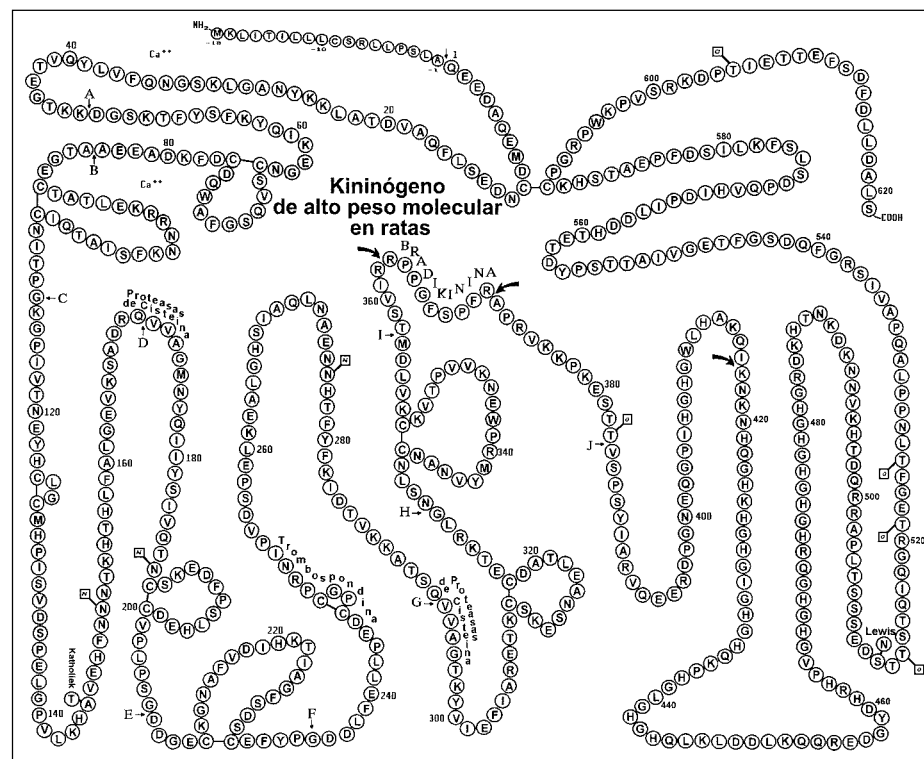


Figura 3. Estructura del kininógeno de alto peso molecular (HK) en ratas. Los números 1-621 son aminoácidos (aa) localizados dentro de la secuencia líder -18 hacia -1. De la letra A a la J representan sitios localizados dentro de las uniones intrón/exón. El dominio 1 (aa 1-113) es codificado por los exones 1, 2 y 3. Dominio 2 (aa 114-234) es codificado por los exones 4, 5 y 6. Dominio 3 (aa 235-357) es codificado por los exones 7, 8 y 9. Dominio 4 (aa 358-383) es codificado por el exón 10. El dominio 5 (aa 384-503) es codificado por la porción 5' del exón 10. Dominio 6 (aa 504-621) es codificado por la porción 3' del exón 10. Las flechas representan los sitios de proteólisis de la kalikreína sobre la molécula del kininógeno. El sitio activo de la proteasa de cisteína (aa 170-174) y el sitio de la unión de trombospondina (aa 244-254) son indicados en el diagrama. También se indican los sitios de los polimorfismos (A145T) sobre la molécula de HK en la rata Brown Norway Katholiek y en la rata Lewis (S511N). El diagrama fue creado por el Dr. Robin Pixley y es reproducido para publicación con permiso de Elsevier.

Figura reproducida con permiso de Elsevier. Chronic intestinal inflammation and angiogenesis in genetically susceptible rats is modulated by kininogen deficiency by Irma Isordia-Salas, Robin A Pixley, Fengling Li, Irma Sainz, R Balfour Sartor, Albert Adam, Robert W Colman 2002; 2: 1896-1905.

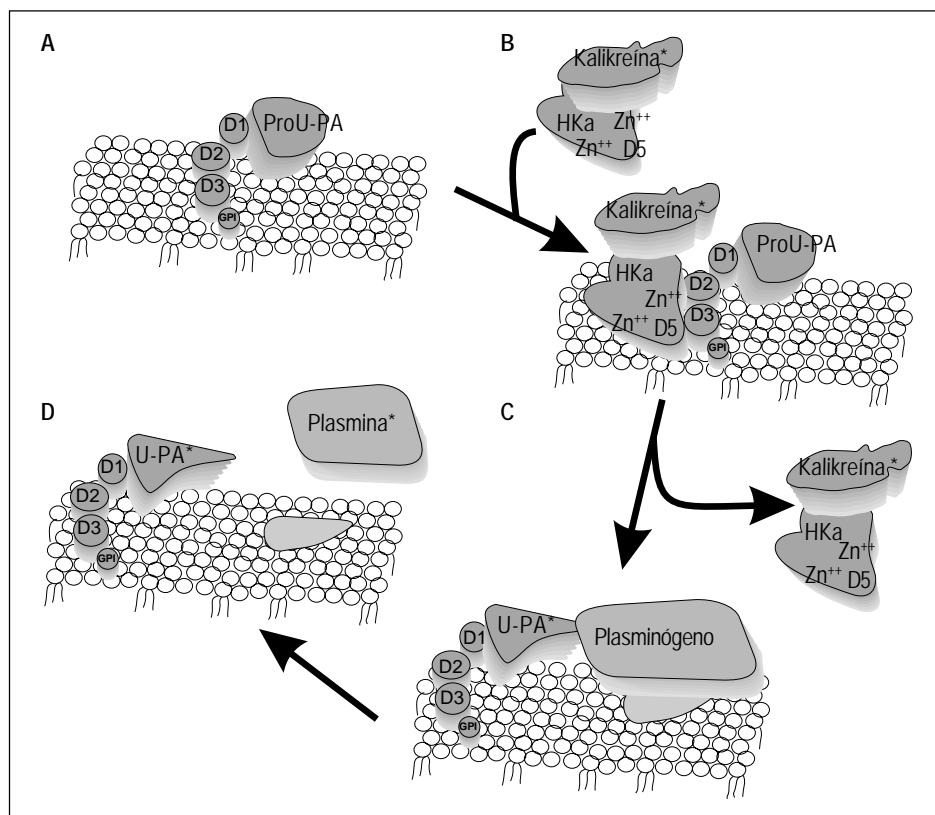


Figura 4. La interacción del kininógeno de alto peso molecular (HK) con sus receptores en la superficie de la célula endotelial y las reacciones enzimáticas que desencadena. De izquierda a derecha: **A.** El receptor de citoqueratina-1, el receptor del factor globular del complemento (gC1q) y el receptor del plasminógeno tipo urokinasa (uPAR) están localizados sobre la membrana de la célula endotelial. El uPAR está constituido por una proteína ancla (GPI) y tres dominios enumerados del más externo (D1) al más cercano a la membrana endotelial (D3). La prourokinasa se une al dominio (D1) de uPAR. **B.** El HK, a través de su dominio 5 (D5) se une a los dominios 2 y 3. **C.** La cercanía de la kalikreína hacia la prourokinasa favorece la activación de la misma en urokinasa y **D.** la consecuente activación del plasminógeno en plasmina. Los asteriscos indican las enzimas activadas.

minios 1, 2 y 3 (D1, D2 y D3), y está unida por un puente disulfuro a la cadena ligera, la cual posee un peso molecular de 56 kDa y está constituida por los dominios 5 y 6 (D5 y D6) (Figura 2). Posterior al primer paso proteolítico, el kininógeno actúa como cofactor acelerando la activación de la prekalikreína y de los factores XII y XI. En el segundo paso proteolítico se produce la liberación del nonapéptido denominado bradikina (BK), el que representa parte del dominio 4 (D4). El tercer sitio de proteólisis está localizado en la región D5 y con ello disminuye el peso de la cadena ligera (45 kDa), la cual queda constituida por parte de D5 y D6. Posterior al tercer proceso proteolítico, la molécula de HK sufre cambios conformacionales (denominándose HKa) adquiriendo la habilidad de unirse a superficies aniónicas y a los receptores de diversas células, incluyendo el receptor del activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPAR) en células endoteliales y leucocitos,¹¹ citoqueratina 1 en células endoteliales,¹² al receptor del factor globular del complemento (gC1q) en plaquetas, linfocitos y células endoteliales,^{13,14} a la glicoproteína Ib en plaquetas,¹⁵ a la trombospodina-1 plaquetaria,¹⁶ y endotelial, así como a la integrina $\alpha M\beta 2$ en leucocitos.¹⁷

Como se mencionó, la cadena pesada del kininógeno activado (HKa) está constituida por D1, D2, D3 y

porción de D4, mientras que la cadena ligera está conformada por D5 y D6 (Figura 2). Cada dominio posee propiedades únicas. El D1 tiene un sitio de baja afinidad al calcio,¹⁸ el D2 y D3 tienen secuencias específicas que inhiben a las proteasas de cisteína,¹⁹ el D3 tiene la capacidad de unirse a plaquetas, neutrófilos y células endoteliales. El D4 contiene la secuencia específica denominada bradikina (BK),²⁰ la cual es un mediador importante con efectos biológicos sobre células endoteliales, del músculo liso, epiteliales y fibroblastos,²¹ produce liberación del activador del plasminógeno tisular,²² así como también la formación de radicales superóxido. En el D5 se encuentra localizado el sitio de unión a diversas células,²³ posee propiedades antiangiogénicas y la secuencia de unión a la heparina.^{24,25} El dominio 6 contiene los sitios de unión a la prekalikreína y el factor XI.²⁶

Se ha demostrado que el KKS se encuentra involucrado en diversas condiciones patológicas como son: lupus eritematoso sistémico (LES),²⁷ en la inflamación generada en la vasculitis,²⁸ en cirugía cardíaca,²⁹ en padecimientos coronarios,³⁰⁻³² diabetes mellitus,^{33,34} abortos de repetición³⁵ y choque séptico inducido por bacterias.^{36,37} El KKS también participa en el proceso de la angiogénesis, el cual está di-

rectamente relacionado con el crecimiento de tumores y su diseminación (metástasis).^{38,39}

Debido a la importancia y a las diversas funciones desempeñadas por el KKS, se han utilizado diversos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, para poder esclarecer sus mecanismos de acción (tanto bioquímicos como moleculares). Gracias a lo anterior, se ha logrado un entendimiento más extenso y detallado de las funciones del kininógeno de alto peso molecular, lo cual permitirá desarrollar nuevas opciones terapéuticas que mejorarán la calidad de vida tanto de los pacientes que sufren enfermedades inflamatorias crónicas como de enfermedades causadas o influenciadas por el incremento de vascularidad (angiogénesis).

INDUCCIÓN DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA DEL INTESTINO, MEDIANTE EL USO DE PG-PS EN UN MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL SUSCEPTIBLE GENÉTICAMENTE

La enfermedad inflamatoria del intestino está representada por la enfermedad de Crohn, cuya evolución está representada por periodos alternados de exacerbaciones y remisiones. La etiología de la enfermedad de Crohn es aún desconocida, pero se ha demostrado que algunos productos bacterianos exógenos y/o endógenos asociados con un componente genético, inducen una excesiva e inapropiada respuesta inmune, la cual permite el relapso de la inflamación.^{40,41}

Se han encontrado diversas alteraciones en los sistemas de coagulación y de fibrinólisis, así como la participación del KKS en la enfermedad de Crohn y la fase aguda de la colitis ulcerativa en el humano.^{42,43}

Uno de los elementos claves en el desarrollo de la inflamación en general es la BK, la cual es producida por la acción proteolítica de la kalikreína sobre su sustrato HK. La BK posee potentes propiedades farmacológicas y proinflamatorias,^{44,45} las cuales ejerce a través de la activación de su receptor 2 constitutivo (B2R) y de su receptor inducible (B1R). La estrecha unión de BK a sus receptores 1 y 2 permite la estimulación de las células endoteliales antes de que BK sea metabolizada por kininasas y aminopeptidasas. La BK posee las siguientes propiedades: estimula la síntesis de prostaciclina en las células endoteliales, incrementa el cAMP celular, inhibiendo de esta manera la función plaquetaria y estimula la formación de óxido nítrico (el cual es un potente vasodilatador). A consecuencia de su efecto vasodilatador, la BK causa incremento de la permeabilidad vascular, hipotensión y diarrea.^{46,47}

El estudio de la patogénesis de la enfermedad de Crohn ha sido favorecido por el desarrollo de modelos animales experimentales, cuya evolución de la enfermedad es similar a la del humano, caracterizada por el desarrollo de inflamación granulomatosa. Estos modelos animales consisten, específicamente, en la utilización de ratas susceptibles genéticamente (Lewis) al desarrollo de enterocolitis aguda y crónica, la cual es inducida mediante la inyección de complejos de lipopolisacárido (LPS) o de polisacárido-peptidoglicano (PG-PS) en múltiples sitios en la pared de la porción distal del íleo y cecum.⁴⁸ La localización y cronicidad del daño tisular que provoca, dependen de la ruta de administración y del componente genético del huésped. El PG-PS estimula a los linfocitos y monocitos, produciendo liberación de citoquinas y de otros mediadores de la inflamación como son: el factor de necrosis tumoral (FNT), interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6), eicosanoides, anafilotoxinas (c3a y c5a) y kininas (kalidina y bradikina).

A través de estos modelos animales, se ha demostrado una activación selectiva del sistema KKS en ratas.⁴⁹ Utilizando ratas genéticamente susceptibles (Lewis) y ratas no susceptibles (Buffalo), y mediante la administración de PG-PS se demostró que ambas especies de ratas (Lewis y Buffalo) desarrollaron inflamación intestinal aguda en la subserosa del intestino. La especie Lewis presentó una reactivación espontánea de enterocolitis granulomatosa crónica e inflamación sistémica, la cual persistió por un periodo de 16 semanas.⁵⁰ La especie Buffalo no presentó reactivación espontánea.

Debido a las propiedades de BK descritas anteriormente y a su importante participación en el fenómeno inflamatorio, se han utilizado diversos péptidos como el P8720, que es un inhibidor reversible y altamente específico de la kalikreína plasmática, el cual logró disminuir la acción enzimática de la kalikeína sobre su sustrato HK, y con ello disminuyó la liberación de bradikina, produciendo un decremento en la intensidad del proceso inflamatorio. Estos resultados indicaron la importancia de la kalikreína como factor quimiotáctico para los neutrófilos. También previno la disminución en los niveles plasmáticos de HK y del factor XI, indicando una disminución en la activación del KKS con la consecuente disminución en la proteólisis de HK por kalikreína y de la liberación de BK, lo cual contribuye en forma importante al desarrollo de la presencia de la inflamación, y de las manifestaciones clínicas presentes en esta enfermedad intestinal.

Mediante el uso de ratas híbridas provenientes del cruce de ratas Lewis (con niveles plasmáticos normales de HK) y ratas Brown Norway Katholiek (con

niveles plasmáticos de HK inferiores de 1%), las cuales presentan un contenido final de 97% de material genético de la especie Lewis, pero sólo con 1% de concentración plasmática de HK pudimos demostrar una atenuación del proceso inflamatorio intestinal, con lo que se pudo corroborar la participación del KKS en el proceso inflamatorio.^{51,52}

ANÁLISIS DE LA ALTERACIÓN MOLECULAR DEL KININÓGENO DE ALTO PESO MOLECULAR QUE CONTRIBUYE AL DESARROLLO DE LA INFLAMACIÓN CRÓNICA EN LAS RATAS LEWIS

Mediante el uso de un experimento *in vitro* se demostró una diferencia en la activación del KKS en las ratas Lewis y Buffalo. El experimento consistió en la activación del KKS usando superficies cargadas negativamente (kaolín), en el cual la molécula de HK presentó una proteólisis de 66% a los 15 minutos posteriores al inicio de su activación, mientras que el mismo ensayo mostró sólo 23% de proteólisis del HK en las ratas Buffalo. Este resultado no se debió a la diferencia en la cantidad de kalikreína plasmática formada como resultado de la exposición al activador kaolín, ya que mediante el uso de un sustrato cromogénico específico para kalikreína se demostró valores de kalikreína plasmática similares en ambos grupos experimentales. En otro estudio realizado *in vitro* utilizando kalikreína humana, se observó un incremento en la proteólisis de la molécula de HK en el plasma de las ratas Lewis comparado con las ratas Buffalo. Asimismo, los niveles de bradikina generada en las ratas Lewis fue mayor comparado con los niveles generados por las ratas Buffalo. El incremento en la proteólisis de HK por la kalikreína incrementa la liberación de bradikina y de HKa en las ratas Lewis.

Nuestros hallazgos demostraron que la causa del incremento de proteólisis del HK entre las ratas Lewis y Buffalo es la sustitución de un solo nucleótido, lo cual produce un cambio en el aminoácido de serina en la rata Lewis por el de asparagina en la rata Buffalo en la posición 511 de la molécula. La presencia de Ser 511 en la molécula de HK facilita su proteólisis con incremento en la liberación de BK y HKa, haciendo a las ratas Lewis más susceptibles a desarrollar lesiones inflamatorias crónicas.⁵³ Si el incremento en la activación del HK en las ratas Lewis predispone al desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas, entonces el bloqueo de la activación del KKS debería disminuir el proceso inflamatorio, por lo que diversos investigadores se han enfocado en el uso terapéutico de inhibidores de la

kalikreína, lo cual produce una disminución en el proceso proteolítico de HK y por consiguiente disminución de la respuesta inflamatoria mediante decremento en los niveles de BK liberados.

MODULACIÓN DE LA ARTRITIS REUMATOIDE MEDIANTE EL USO DE INHIBIDORES DE LA KALIKREÍNA Y UN ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECÍFICO CONTRA HK

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune, caracterizada por inflamación crónica sistémica.⁵⁴ La enfermedad ocurre como resultado de una respuesta inmunológica excesiva ante un antígeno (s) no identificado. Durante el desarrollo de la enfermedad, el paciente presenta inflamación sinovial persistente, la cual involucra las articulaciones periféricas con distribución simétrica. La característica de la enfermedad es el potencial de la inflamación sinovial para causar la destrucción del cartílago y erosión del hueso.

Diversos investigadores han demostrado la participación del KKS en el proceso inflamatorio artrítico mediante la detección de la presencia de kalikreína y bradikina en el fluido sinovial de pacientes con artropatía reumática.^{55,56}

Estudios realizados por nuestro laboratorio han confirmado la activación del KKS en el síndrome de artritis aguda e inflamación sistémica.⁵⁷ Para delimitar la participación del KKS como componente proinflamatorio en la artritis y específicamente de la kalikreína, se utilizó el péptido P8720 (inhibidor específico) en un modelo animal de artritis. Mediante una sola inyección intraperitoneal (IP) del polímero bacteriano PG-PS en ratas de la especie Lewis inducimos una respuesta bifásica presentando una etapa aguda seguida del desarrollo de la etapa crónica, siendo ésta progresiva, con artritis destructiva, anemia y la presencia de granulomas hepáticos. El diámetro articular disminuye durante los días 9-12 siguientes a la inyección del polímero, con la presencia de un nuevo incremento en el proceso inflamatorio articular en el día 15, iniciando el ciclo de recurrencia y remisión e indicando el inicio de la fase crónica de la enfermedad caracterizada por sinovitis crónica y erosión ósea similar a la artritis reumatoide en el humano. Como mencionamos, la fase crónica es caracterizada por ciclos repetidos de exacerbaciones y remisiones durante los siguientes 4-6 meses y culminan en fibrosis y anquilosis de la articulación. Así pues, los cambios histológicos en este modelo animal de artritis crónica incluyen: sinovitis, formación de pannus, destrucción

del cartílago y del hueso con inflamación granulomatosa de tejidos periarticulares. La fase crónica está mediada por los linfocitos T, con una contribución importante del sistema inmunológico.

En este estudio el uso del inhibidor específico de la kalikreína P8720 disminuyó la activación del KKS. Los niveles plasmáticos de HK permanecieron constantes y los niveles de PK disminuyeron tan sólo en 24% en comparación con los niveles registrados previos a la inducción de la artritis. Las manifestaciones extraarticulares (hepatomegalia, leucocitosis y anemia) también disminuyeron. La inflamación articular decreció en 61% en comparación con el grupo en el cual no se administró el inhibidor específico de kalikreína (P8720).

Nosotros hemos descrito el sitio de unión del anticuerpo C11C1 sobre la molécula del kininógeno, el cual está localizado entre los aminoácidos H441-K502 de la cadena ligera del kininógeno (D5).⁵⁸ Nuestros resultados mostraron que el anticuerpo C11C1 previno el desarrollo de la artritis (edema articular) durante el transcurso de la evolución de la enfermedad, disminuyendo la intensidad y la extensión sistémica de la inflamación, con una modificación mínima en los niveles plasmáticos de las proteínas componentes del KKS, indicando disminución de su activación.⁵⁹

El mecanismo de acción del anticuerpo C11 C1 es mediante la inhibición del acoplamiento de HK a la superficie celular,⁶⁰⁻⁶² debido a que la proteólisis de HK por kalikreína solamente ocurre sobre la superficie de las células endoteliales,⁶³ esta acción disminuye la proteólisis de HK por kalikreína, y con ello decrece la formación de HKa y de BK. Disminuyendo la formación de estos dos mediadores se inhibe el proceso local de inflamación en las articulaciones y la inflamación sistémica.

En conclusión, nuestros resultados indican que C11C1, un anticuerpo monoclonal contra D5 de HK atenúa la activación de KKS y la inflamación local y sistémica inducida por el PG-PS en la rata Lewis. Por lo que la inhibición de HK quizá sea un enfoque apropiado para el futuro desarrollo de medicamentos encaminados a la terapia de artropatías inflamatorias crónicas en el humano.

EFFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DE LA BK EN EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS PRODUCIDA POR PG-PS

Como mencionamos anteriormente, la BK ejerce su efecto proinflamatorio a través de sus receptores B1 (B1R) y B2 (B2R), los cuales se localizan en la su-

perficie celular. Dichos receptores han sido definidos con base en sus funciones farmacológicas.⁶⁴ El receptor B2 es expresado en forma constitutiva a nivel vascular y en neutrófilos.⁶⁵

El B2R es el principal receptor de bradikina en condiciones fisiológicas y en la respuesta inflamatoria aguda. El receptor B2 responde a estímulos en forma potente, rápida y por corto periodo de tiempo, debido a que pierde su sensibilidad funcional rápidamente. La expresión del receptor B1 es casi indetectable en condiciones fisiológicas y su expresión se intensifica en estados de inflamación y daño tisular. Después de la activación, el receptor B1 es expresado en linfocitos, monocitos⁶⁵ y endotelio vascular. El número de receptores se incrementa por la acción de factores del crecimiento y citoquinas que participan en la respuesta inflamatoria o por la presencia de lipopolisacárido bacteriano (LPS).

La importancia de B2R en el proceso inflamatorio agudo se ha demostrado mediante el uso de diversos modelos animales experimentales de inflamación cutánea, así como visceral, pancreatitis experimental y artritis inducida en conejos. En estos modelos animales se encontró que el tratamiento con antagonistas del B2R disminuyó la intensidad de la inflamación sistémica y mejoró el estado de salud en general de los animales tratados.⁶⁶ Nuestro laboratorio demostró que el tratamiento con antagonistas de los receptores B2 atenuó el proceso inflamatorio en el modelo animal de artritis aguda inducido mediante la administración intraperitoneal de PG-PS.⁶⁷ Asimismo, encontramos que mediante la inhibición de los receptores B1, la respuesta inflamatoria se incrementa y persiste en comparación con la evolución natural de la enfermedad en este modelo animal. En conclusión, el uso de antagonistas de los receptores de la BK demuestra que la inhibición del B1R o el prolongamiento de la función de B2R intensifican el proceso inflamatorio, y su activación secuencial es necesaria para el control de la respuesta inflamatoria.^{68,69}

HK Y SU EFECTO EN LA NEOVASCULARIZACIÓN

La formación de nuevos vasos sanguíneos, también conocida como neovascularización o angiogénesis, consiste en un proceso secuencial que incluye la separación, migración, proliferación, proteólisis y formación de túbulos por las células endoteliales. Diversos estudios realizados demuestran que la molécula de HK participa en este complejo proceso.

El primer paso de la angiogénesis es la separación de células endoteliales. Actualmente se conoce que el

kininógeno activado (HKa) facilita este proceso, a través de mecanismos diferentes: la unión y el desplazamiento de proteínas adhesivas en materiales biológicos,⁷⁰ inhibición de la adhesión de las proteínas fibrinógeno y vitronectina a células sanguíneas y endoteliales, inhibición de la adhesión de células o superficies proteicas, ya que siendo un monómero se puede unir a células o a dichas superficies proteicas, pero no a las dos.⁷¹ Esta propiedad antiadhesiva del HKa depende de la acción de su dominio 5 (D5) localizado en la cadena ligera.⁷²

El segundo paso en el proceso angiogénico requiere de la actividad profibrinolítica de HK. Se ha demostrado mediante estudios *in vivo*, que el HK se asocia con prekalikreína en un complejo no covalente sobre la superficie endotelial.⁷³ La proilcarboxipeptidasa (PCP) es una proteasa de serina del endotelio que transforma la prekalikreína en kalikreína.⁷⁴ La kalikreína, a su vez, además de activar al HK, transforma la prourokinasa en urokinasa, y el FXII en FXIIa activándolos, mostrando de esta manera que la activación de la prekalikreína en la superficie endotelial posee una actividad sinérgica, debido a que inicia el sistema de contacto mediante la activación del FXII y activa el HK, produciendo HKa y BK. Nosotros identificamos al receptor del activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPAR) como la proteína receptora del HK en la superficie endotelial.¹¹ Así mismo, demostramos que el anticuerpo contra HK-D5 (C11C1) también bloquea la unión de HK a la superficie endotelial.⁷⁵ La molécula de prourokinasa se une al dominio 1 de la molécula de uPAR (Figura 4a) mientras que el HK se une a los dominios 2 y 3 de la misma molécula (uPAR) a través de su dominio 5 (D5) y a kalikreína mediante su dominio 6 (D6) (Figura 4b). Debido a la cercanía de la molécula de kalikreína a la prourokinasa, su activación a urokinasa se ve favorecida (Figura 4c). La urokinasa, a su vez, activa el plasminógeno en plasmina (Figura 4d).

Diversos investigadores han demostrado la presencia de dos receptores de HK en la superficie endotelial: receptor gC1q⁷⁶ y el receptor de citoqueratina 1,⁷⁷ los cuales se colocalizan con la molécula de uPAR. Además, el hecho de que los dominios 2 y 3 del receptor de la urokinasa poseen funciones adhesivas en su interacción con la vitronectina apoya la hipótesis de que el HK utiliza funciones antiadhesivas, ya que la interacción de la vitronectina con la superficie endotelial es bloqueada por HKa y D5 indicando que la acción de HK posee, por lo menos, dos mecanismos: una interacción directa (HK- uPAR) y la unión con desplazamiento de la superficie celular como es el caso de la interacción de HKa con vitro-

nectina, en el cual ambas moléculas forman un complejo que les impide unirse a uPAR.⁷⁸

El tercer paso en la angiogénesis es la migración de células endoteliales hacia los tejidos, para la cual se requiere penetrar la membrana basal. La enzima plasmina proteoliza a la proteína laminina y al fibrinógeno, así como también lleva a cabo la activación de otras enzimas (metaloproteinasas), que hidrolizan al colágeno. El complejo HK-kalikreína favorece la activación de prourokinasa a urokinasa, a través de la acción de la enzima kalikreína, lo cual puede ser bloqueado con péptidos derivados del D6 de HK (donde se encuentra el sitio de unión de la kalikreína: S565-K595).³⁵

El hecho de que HK posee propiedades proangiogénicas fue demostrado mediante el estudio del efecto de HK en el ensayo de la membrana corioalantoidea de pollo (CAM assay) donde HK, al igual que el factor básico de crecimiento de los fibroblastos (bFGF o FGF2), incrementaron la neovascularización en el CAM. En dicho ensayo observamos que la inhibición de la kalikreína con la consecuente inhibición en la formación de BK disminuyó la vascularidad en forma significativa. Este hallazgo fue confirmado al demostrarse que el inhibidor de la tripsina de soya, el cual inactiva a la kalikreína plasmática, inhibe el efecto proangiogénico de HK,⁷⁹ sugiriendo que la liberación de BK es importante en dicho proceso proangiogénico. Se obtuvieron resultados similares (inhibición de la neovascularización) al usar el anticuerpo monoclonal (C11C1), el cual inhibió la unión de HK a la superficie endotelial. Mediante el uso del ensayo de CAM se demostró que bFGF, HK y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) estimularon la angiogénesis, mientras que el anticuerpo C11C1 inhibió dicho proceso angiogénico.⁵⁹

Estudios realizados en ratas deficientes de HK, en los cuales se ha demostrado que la angiogénesis se encuentra suprimida en este tipo de animales, confirman nuestra hipótesis de que HK es proangiogénico.⁸⁰

En forma opuesta a la molécula completa de HK (proangiogénico), el kininógeno activado (HKa) posee propiedades antiangiogénicas, lo cual también se demostró mediante el ensayo de CAM. En este estudio la adición de bFGF favoreció la aparición de nuevos vasos (angiogénesis) mientras que HKa y la molécula recombinante de D5 inhibió casi en su totalidad el efecto estimulador de bFGF. Para definir la causa de la disminución en la proliferación celular, se investigó la participación de las ciclinas (reguladores del ciclo celular),⁸¹ y el efecto de la molécula de D5 sobre las mismas. Mediante el uso de anticuerpos específicos contra las ciclinas demostramos que la molécula

de D5 inhibió la expresión de ciclina D1, la cual, a su vez, es inducida por bFGF en cultivos de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), y de células de la microvasculatura dérmica humana. Además de la disminución de la proliferación celular, se encontraron cambios morfológicos característicos de apoptosis, sugiriendo que D5 es una molécula que induce apoptosis.⁸² De esta manera, nuestros hallazgos demuestran que HKa es una molécula antiangiogénica, mientras que la molécula intacta (HK) es proangiogénica.

Actualmente, una de las áreas de mayor enfoque de la investigación científica es el desarrollo de drogas terapéuticas en contra de padecimientos oncológicos. Folkman⁸³ fue el primero en postular que la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes (angiogénesis) es esencial para el crecimiento tumoral, por lo tanto, la inhibición de la angiogénesis inhibe la expansión del tumor. La búsqueda de drogas antiangiogénicas ha llevado al descubrimiento de diversos fragmentos, producto de la proteólisis de moléculas proangiogénicas, las cuales incluyen proteínas plasmáticas, que son potentes inhibidores de este complejo proceso,⁸⁴ tales como la angiostatina (derivado del plasminógeno) y endostatina⁸⁵ (derivado del colágeno XVII).⁸⁶ Asimismo, nuestro laboratorio ha descubierto un nuevo polipéptido proangiogénico, que está constituido por parte del dominio número 5 (D5) de la molécula del kininógeno de alto peso molecular (HK), el cual hemos denominado kininostatina.^{87,88} La kininostatina es producida por la acción proteolítica de kalikreína y del factor XI activado (FXIa).

También encontramos que la administración de mAb C11C1 y kininostatina (D5) disminuyeron la neovascularización del fibrosarcoma en el CAM,⁵⁹ así como también en el estudio llevado a cabo con células tumorales de colon implantado en ratones inmunodeficientes y en el tratamiento de hibridomas implantados en ratones inmunocompetentes. Al disminuir la vascularidad de los tumores implantados en estos modelos animales experimentales, también disminuyó, significativamente, el tamaño de dichos tumores. Estos hallazgos sugieren que mAb C11C1 y kininostatina (D5) tienen potencial terapéutico en el tratamiento de tumores humanos.

CONCLUSIÓN

En la última década, el conocimiento de las funciones de HK se ha multiplicado en forma exponencial. Inicialmente se pensaba que la única función de HK era ser el precursor de BK. El avance en las áreas de bioquímica y biología molecular nos ha

permitido conocer su estructura molecular, en la cual se basan sus diversas funciones. Estos avances demuestran que ambas cadenas poseen diferentes funciones e inclusive que la molécula completa posee funciones que son inhibidas por sus propias fracciones proteolíticas (HKa y kalidina). Actualmente se concibe a la molécula de HK no sólo como una proteína del sistema de coagulación, sino también como una molécula con propiedades antiadhesivas, proinflamatorias, profibrinolíticas y antiangiogénicas. Cada una de estas funciones ofrece una posibilidad terapéutica en la batalla contra las enfermedades inflamatorias tanto agudas como crónicas, así como en la búsqueda de tratamientos oncológicos.

REFERENCIAS

- Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology, modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997; 90: 3819-43.
- Chavakis T, Pixley RA, Isordia-Salas I, Colman RW, Preissner KT. A novel antithrombotic role for high molecular weight kininogen as inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 function. *J Biol Chem* 2002; 277: 32677-82.
- Chavakis T, Preissner KT. Potential pharmacological applications of the antithrombotic molecule high molecular weight kininogen. *Current Vasc Pharmacol* 2003; 1: 59-64.
- Colman RW, White JV, Scovell S, Stadnicki A, Sartor RB. Kininogen are antithrombotic proteins in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2245-50.
- Campbell DJ. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 1060-5.
- Kaplan AP, Joseph K, Silverberg M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 195-209.
- Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. Assembly and activation of the plasma kallikrein-kinin system: a new interpretation. *Int Immunopharmacology* 2002; 2: 1841-19.
- Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, Nakanishi S. Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem* 1985; 260: 8610-7.
- Barros NM, Tersariol IL, Oliva ML, Araujo MS, Sampaio CA, Juliano L, da Motta G. High molecular weight kininogen as substrate for cathepsin G. *Biol Chem* 2004; 385: 515-5.
- Kozik A, Moore RB, Potempa J, Imamura T, Rapala-Kozik M, Travis J. A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikrein on native and oxidized kininogen. *J Biol Chem* 1998; 273: 33224-9.
- Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S, Yan W, Wang J, Mazar A, McCrae KR. Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* 1997; 100: 1481-7.
- Mahdi F, Shariat-Madar Z, Tood RF 3rd, Figueroa CD, Schmaier AH. Expression and colocalization of cytokeratin 1 and urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cell. *Blood* 2001; 97: 2342-50.
- Herwald H, Dedio J, Kellner R, Loos M, Muller-Esterl W. Isolation and characterization of the kininogen-binding protein

- p33 from endothelial cells. Identity with the gC1q receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 13040-7.
14. Joseph K, Ghebrehiwet B, Peerschke EI, Reid KB, Kaplan AP. Identification of the zinc-dependant endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: identity with the receptor that binds to the globular "heads" of C1q (gC1q-R). *Proc Natl Acad USA* 1996; 93: 8552-7.
 15. Bradford HN, Pixley RA, Colman RW. Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 2000; 275: 22756-63.
 16. DeLa Cadena RA, Kunapuli SP, Walz DA, Colman RW. Expression of the thrombospondin 1 on the surface of activated platelets mediates their interaction with the heavy chains of human kininogens through Lys 244-Pro254. *Thromb Haemost* 1998; 79: 186-94.
 17. Chavakis T, Kanse SM, Pixley RA, May AE, Isordia-Salas I, Colman RW, Preissner KT. Regulation of leukocyte recruitment by polypeptides derived from high molecular weight kininogen. *FASEB J* 2001; 15: 2365-76.
 18. Higashiyama S, Ohkubo I, Ishiguro H, Sasaki M, Matsuda T, Nakamura R. Heavy chain of human high molecular weight and low molecular weight kininogens binds calcium ion. *Biochemistry* 1987; 26: 7450-8.
 19. Bradford HN, DeLa Cadena RA, Kunapuli SP, Dong JF, Lopez JA, Colman RW. Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib IX-V-complex. *Blood* 1997; 90: 1508-15.
 20. Joseph K, Kaplan AP. Formation of bradykinin: a major contributor to the innate inflammatory response. *Adv Immunol* 2005; 86: 159-208.
 21. Zhao Y, Qiu Q, Mahdi F, Shariat-Madar Z, Rojkaer R, Schmaier AH. Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation and NO formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1821-H1829.
 22. Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE. Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. *Thromb Haemost* 1997; 77: 522-5.
 23. Maeda H, Akaike J, Wu J, Noguchi Y, Sakata Y. Bradykinin and nitric oxide in infectious disease and cancer. *Immunopharmacology* 1996; 33: 222-30.
 24. Lin Y, Pixley RA, Colman RW. Kinetic analysis of the role of zinc in the interaction of domain 5 of high molecular weight kininogen (HK) with heparin. *Biochemistry* 2000; 39: 5104-10.
 25. Herwald H, Morgelin M, Svensson HG, Sjobring U. Zinc-dependent conformational changes in domain D5 of high molecular mass kininogen modulates contact activation. *Eur J Biochem* 2001; 268: 396-404.
 26. Motta G, Shariat-Madar Z, Mahdi F, Sampaio CA, Schmaier AH. Assembly of high molecular weight kininogen and activation of prekallikrein on cell matrix. *Thromb Haemost* 2001; 86: 840-7.
 27. Dellalibera-Joviliano R, Reis ML, Donadi EA. Kinin system in lupus nephritis. *Int Immunopharmacology* 2001; 1: 1889-96.
 28. Kahn R, Herwald H, Muller-Esterl W, Schmitt R, Sjogren AC, Truedsson L, Karpman D. Contact-system activation in children with vasculitis. *Lancet* 2002; 360: 535-41.
 29. Gallimore MJ, Jones DW, Winter M, Wendel HP. Changes in high molecular weight kininogen levels during and after cardiopulmonary bypass surgery measured using a chromogenic peptide substrate assay. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 561-8.
 30. Merlo C, Willemin WA, Redondo M, Furlan M, Sulzer I, Kremer-Hovinga J, Binder BR, Lammle B. Elevated levels of plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen and factor XI in coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2002; 161: 261-7.
 31. Sharma JN. Does the kinin system mediate in cardiovascular abnormalities? An overview *J Clin Pharmacol* 2003; 43: 1187-95.
 32. Campbell DJ, Dixon B, Kladis A, Kemme M, Santamaria JD. Activation of the kallikrein-kinin system by cardiopulmonary bypass in humans. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol* 2001; 281: R1059-R1070.
 33. Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. Angiotensin and bradykinin: targets for the treatment of vascular and neuro-glial pathology in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Dis* 2004; 10: 3313-30.
 34. Jaffa AA, Durazo-Arvizu R, Zheng D, Lackland DT, Srikanth S, Garvey WT, Schmaier AH; DCCT/EDIC Study Group. Plasma prekallikrein: a risk marker for hypertension and nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 1215-21.
 35. Sugi T, Makino T. Antiphospholipid antibodies and kininogens in pathologic pregnancies: a review. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47: 283-8.
 36. Sriskandan S, Kembell-Cook G, Moyes D, Canvin J, Tuddenham E, Cohen J. Contact activation in shock caused by invasive group A *Streptococcus pyogenes*. *Crit Care Med* 2002; 28: 3684-91.
 37. Shariat-Madar Z, Schmaier AH. The plasma kallikrein-kinin and renin angiotensin systems in blood pressure regulation in sepsis. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 3-13.
 38. Zhang JC, Claffey K, Sakthivel R, Darzynkiewicz Z, Shaw DE, Leal J, Wang YC, Lu FM, McCrae KR. Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *FASEB J* 2000; 14: 2589-600.
 39. Juarez JC, Guan X, Shipulina NV, Plunkett ML, Parry GC, Shaw DE, Zhang JC, Rabbani SA, McCrae KR, Mazar AP, Morgan WT, Donate F. Histidine-proline-rich glycoprotein has potent antiangiogenic activity mediated through the histidine-proline-rich domain. *Cancer Res* 2002; 62: 5344-50.
 40. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-29.
 41. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: S5-S11.
 42. Devani M, Cugno M, Vecchi M, Ferrero S, Di Berardino F, Avesani EC, Franchis R, Colman RW. Kallikrein-kinin system activation in Crohn's disease: differences in intestinal and systemic markers. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2026-32.
 43. DeLa Cadena, Sartor RB, Adam A, Raymond B, Legris F, Colman RW. Role of kallikrein-kinin system in the pathogenesis of bacterial cell wall-induced inflammation and enterocolitis. *Trans Assoc Am Physicians* 1992; 105: 229-37.
 44. Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation; pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994; 106: 533-9.
 45. Warren JB, Loi RK. Captopril increases skin microvascular blood flow secondary to bradykinin, nitric oxide, and prostaglandins. *FASEB J* 1995; 9: 411-18.
 46. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 1-80.
 47. Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. Vasoactive potential of the b (1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Cir Res* 2001; 88: 275-81.
 48. Sartor RB, Rath HC, Lichtman SN, van Tol EA. Animal models of intestinal and joint inflammation. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996; 10: 55-76.
 49. Sartor RB, DeLa Cadena RA, Green KD, Stadnicki A, Davis SW, Schwab JH, Adam AA, Raymond P, Colman RW. Selective kallikrein-kinin system activation in inbred rats differentially susceptible to granulomatous enterocolitis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1467-81.

50. Stadnicki A, Gonciarz M, Niewiarowski TJ, Hartleb J, Rudnicki M, Merrell NB, DeLa Cadena RA, Colman RW. Activation of plasma contact and coagulation systems and neutrophils in the active phase of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2356-66.
51. Isordia-Salas I, Pixley RA, Li F, Sainz I, Sartor RB, Adam A, Colman RW. Kininogen deficiency modulates chronic intestinal inflammation in genetically susceptible rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G 180-G186.
52. Isordia-Salas I, Pixley RA, Li F, Sainz I, Balfour Sartor R, Adam A, Colman RW. Chronic intestinal inflammation and angiogenesis in genetically susceptible rats is modulated by kininogen deficiency. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 1895-905.
53. Isordia-Salas I, Pixley RA, Parekh H, Kunapuli SP, Li F Stadnicki A, Lin Y, Sartor RB, Colman RW. The mutation Ser511N leads to N-glycosylation and increases the cleavage of high molecular weight kininogen in rats genetically susceptible to inflammation. *Blood* 2003; 102: 2835-42.
54. Corrigal VM, Panayi GS. Autoantigens and immune pathways in rheumatoid arthritis. *Crit Rev Immunol* 2002; 22: 281-93.
55. Bond AP, Lemon M, Dieppe PA, Bhoola KD. Generation of kinins in synovial fluid from patients with arthropathy. *Immunopharmacology* 1997; 36: 209-16.
56. Selwyn BM, Figueroa CD, Fink KE, Swan A, Dieppe PA, Bhoola KD. A tissue kallikrein in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 128-33.
57. DeLa Cadena RA, Laskin KJ, Pixley RA, Sartor RB, Schwab JH, Back N, Bedi GS, Fisher RS, Colman RW. Role of kallikrein-kinin system in pathogenesis of bacterial cell-wall-induced inflammation. *Am J Physiol* 1991; 260: G213-G219.
58. DeLa Cadena RA, Colman RW. The sequence HGLGHGHE-QQHGLGHGH in the light chain of high molecular weight kininogen serves as a primary feature for zinc-dependant binding to an anionic surface. *Prot Sci* 1992; 1: 151-60.
59. Espinola RG, Uknis A, Sainz IM, Isordia-Salas I, Pixley RA, DeLa Cadena R, Long W, Agelan A, Gaughan J, Adam A, Colman RW. *Am J Pathol* 2004; 165: 969-76.
60. Colman RW, Pixley RA, Sainz I, Song JS, Isordia-Salas I, Muhamed SN, Powell JA Jr, Mousa SA. Inhibition of angiogenesis by antibody blocking the action of proangiogenic high-molecular-weight kininogen. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 164-70.
61. Colman RW. The contact system and angiogenesis: potential for therapeutic control of malignancy. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 45-61.
62. Guo YL, Wang S, Colman RW. Kininostatin as an antiangiogenic inhibitor; what we know and what we do not know. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 1931-40.
63. Rojksjaer R, Hasan AA, Motta G, Schousboe I, Schmaier AH. Factor XII does not initiate prekallikrein activation on endothelial cells. *Thromb Haemost* 1998; 80: 74-81.
64. Marceau F, Regoli D. Bradykinin receptors ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 845-52.
65. Bockmann S, Paegelow I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocyte. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 587-92.
66. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 161-76.
67. Uknis AB, DeLa Cadena RA, Janardham R, Sartor RB, Whalley ET, Colman RW. Bradykinin receptor antagonist type 2 attenuate the inflammatory changes in peptidoglycan-induced acute arthritis in the Lewis rat. *Inflamm Res* 2001; 50: 149-55.
68. Sainz IM, Uknis AB, Isordia-Salas I, DeLa Cadena RA, Pixley RA, Colman RW. Interactions between bradykinin (BK) and cell adhesion molecule (CAM) expression in peptidoglycan-polysaccharide (PG-PS)-induced arthritis. *FASEB J* 2004; 18: 887-9.
69. Stewart JM. Bradykinin antagonists as anti-cancer agents. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2036-42.
70. Yung Y, Lim F, Khan MM, Kunapuli SP, Rick L, Colman RW, Cooper SL. High molecular weight kininogen preadsorbed to glass surface markedly neutrophil adhesion. *Biomaterials* 2000; 21: 405-14.
71. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. Recombinant prolyl-carboxypeptidase activates plasma prekallikrein. *Blood* 2004; 103: 4554-61.
72. Al-Fakhri N, Chavakis T, Schmidt-Woll, Huang B, Cherian SM, Bobryshev YV, Lord RS, Katz N, Preissner KT. Induction of apoptosis in vascular cells by plasminogen activator inhibitor-1 and high molecular weight kininogen correlates with their anti-adhesive properties. *Biol Chem* 2003; 384: 423-35.
73. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator. *J Biol Chem* 2002; 277: 17962-9.
74. Schmaier AH. Plasma kallikrein-system a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Curr Opin Hematol* 2002; 7: 261-5.
75. Song JS, Sainz IM, Cosenza SC, Isordia-Salas I, Bior A, Bradford HN, Guo YL, Pixley RA, Reddy EP, Colman RW. Inhibition of tumor angiogenesis in vivo by monoclonal antibody targeted to domain 5 of high molecular weight kininogen. *Blood* 2004; 104: 2065-72.
76. Herwald H, Renne T, Meijers JC, Chung DW, Page JD, Colman RW, Muller-Esterl W. Mapping of the discontinuous kininogen binding site of prekallikrein. A distal binding segment is located in the heavy chain domain A4. *J Biol Chem* 1996; 271: 13061-7.
77. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. Assembly and activation of the plasma kallikrein-kinin system a new interpretation. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 1841-9.
78. Chavakis T, Kanse SM, Lupu F, Hammes HP, Muller-Esterl W, Pixley RA, Colman RW, Preissner KT. Different mechanisms define the antiadhesive function of high molecular weight kininogen in integrin-and urokinase receptor-dependent interactions. *Blood* 2000; 96: 514-22.
79. Hayashi I, Amano H, Yoshida S, Kamata K, Kamata M, Inukai M, Fujita T, Kumagai Y, Furudate S, Majima M. Suppressed angiogenesis in kininogen-deficiencies. *Lab Invest* 2002; 82: 871-80.
80. Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, Granger HJ, Ziche M. The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J* 2001; 15: 1487-9.
81. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1988; 60: 601-17.
82. Guo YL, Wang S, Colman RW. Kininostatin, an antiangiogenic inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1427-33.
83. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003; 3: 643-51.
84. Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 1521-4.
85. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-28.
86. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an en-

ogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-85.

87. Colman RW, Jameson BA, Lin Y, Johnson D, Mousa SA. Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood* 2000; 95: 543-50.
88. Colman RW. Inhibition of angiogenesis by a monoclonal antibody to kininogen as well as by kininostatin, which block proangiogenic high molecular weight kininogen. *Int Immunopharmacol* 2002; 2: 1887-94.

Reimpresos:

Dra. Irma Isordia-Salas

The Sol Sherry Thrombosis Research Center

Temple University School of Medicine

OMS Room 403

3400 North Broad Street

Philadelphia, PA. 19140 USA

Fax: 215-707-2523

Correo electrónico: irmaisordia@yahoo.com.mx

Recibido el 11 de agosto de 2004.

Aceptado el 28 de abril de 2005.