

# Expresión de VEGF-A y VEGFR2 en Miocardio de Pollos Tratados con Ácido Acetilsalicílico (AAS)

## VEGF-A and VEGFR2 Expression in Chicken Myocardium Treated with Acetylsalicylic Acid (AAS)

Francisco Sepúlveda<sup>1</sup>; Eduardo Saavedra<sup>1</sup>; Rodrigo Sánchez<sup>1</sup>; Sebastián Córdova<sup>1</sup>; David Lemus<sup>1</sup>; Marcela Fuenzalida<sup>1</sup>; Marcela Vergara<sup>2</sup> & Carlos Rosas<sup>2</sup>

---

SEPÚLVEDA, F.; SAAVEDRA, E.; SÁNCHEZ, R.; CÓRDOVA, S.; LEMUS, D.; FUENZALIDA, M.; VERGARA, M. & ROSAS, C. Expresión de VEGF-A y VEGFR2 en miocardio de pollos tratados con ácido acetilsalicílico (AAS). *Int. J. Morphol.*, 37(1):48-53, 2019.

**RESUMEN:** Los niveles de VEGF y su unión a sus receptores son etapas claves en la regulación de la angiogénesis. El ácido acetilsalicílico (AAS), ampliamente utilizado en tratamiento post infarto al miocardio ha mostrado poseer un efecto antiangiogénico en modelos tumorales. Este efecto potencialmente contraproducente requiere ser estudiado en miocardio. El objetivo del presente trabajo es cuantificar el efecto de AAS y de ácido salicílico (AS) sobre la vascularización en membrana alantocoriónica (MAC) y sobre los niveles de VEGF-A y VEGFR2 en miocardio de embriones de pollo. Para ello, treinta fetos de pollo White Leghorn fueron instilados a los 10 días de gestación con 60 µL de DMSO 0,1 % (control) o conteniendo además 0,3 µmol de AAS o AS. A las 48 horas se realizó procesamiento histológico de MAC para recuento de vasos sanguíneos y de tejido cardíaco para cuantificar VEGF-A y VEGFR2 por inmunohistoquímica. La inmunoreactividad fue cuantificada mediante Image J. Tanto AAS como AS disminuyeron la densidad microvascular de MAC. En miocardio, AAS aunque no AS, disminuyó la concentración de VEGFR2. No hubo efecto sobre VEGF-A. En nuestro modelo experimental, fetos de pollo a los 10 días de gestación también se observó el efecto inhibitorio de AAS sobre la angiogénesis en MAC. La disminución de VEGFR2 en cardiomiocitos sugiere que AAS también afecta la angiogénesis en miocardio sano, modificando la disponibilidad del receptor a VEGF. Estos hallazgos nos permiten postular que AAS podría interferir con la regeneración de tejido, en situaciones como post infarto al miocardio.

**PALABRAS CLAVE:** Aspirina; Corazón; Receptor de VEGF; Angiogénesis.

---

## INTRODUCCIÓN

La angiogénesis corresponde al proceso por el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Este fenómeno se presenta normalmente durante el desarrollo embrionario, en el crecimiento del organismo, en la fase proliferativa del ciclo menstrual y durante la formación de la placenta; además en procesos de cicatrización de las heridas y regeneración de órganos.

Según Hoeben *et al.* (2004) la angiogénesis se encuentra sujeta a un complejo sistema de control fisiológico conocido como "balance angiogénico", en el que participan factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Entre los factores proangiogénicos se encuentran los factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF), los que a través de la unión a su receptor (VEGFR) modulan la angiogénesis e incrementan la permeabilidad microvascular. Dentro de la

familia de los VEGF, el VEGF-A se une a VEGFR1 y a VEGFR2, dos receptores con actividad tirosina kinasa, expresados por las células endoteliales de la pared vascular. Molin & Post (2007) reportaron que VEGF-A promueve la angiogénesis a través de su unión a VEGFR2, iniciando una cascada de señales que estimulan el crecimiento, la supervivencia y la proliferación de las células del endotelio vascular.

La interacción de VEGF-A con sus receptores es esencial para establecer un sistema vascular funcional durante la embriogénesis y al comienzo del desarrollo postnatal e incluso en procesos patológicos como cáncer. Aun cuando este proceso tiene una actividad fisiológica limitada en los adultos, se activa y tiene un rol relevante cuando hay procesos de reparación tisular. Dado esto, es interesante caracterizar agentes que participan en la modulación de este proceso de angiogénesis.

<sup>1</sup> Laboratorio de Embriología Experimental y Molecular, ICBM, Fac. de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>2</sup> Facultad de Medicina y Ciencia, Universidad San Sebastián, Santiago, Chile.

El Ácido Acetilsalicílico (AAS) ha sido ampliamente prescrito como antiagregante plaquetario, antipirético y antiinflamatorio. Adicional a estos efectos, Khan & Mehta (2005) demostraron que AAS tiene efectos antiangiogénicos. Si bien es cierto que es conocida la acción inhibitoria de AAS sobre las enzimas cicloxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), impidiendo así la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, el mecanismo por el cual inhibe la angiogénesis no está totalmente estudiado. Meek *et al.* (2010) reportaron que el efecto inhibitor de AAS sobre COX-1 y COX-2 está mediado por acetilación de un residuo de serina en el sitio activo. Complementando esta evidencia, la acetilación de COX-2 conduce a la formación de lipoxinas, potentes inhibidores de la angiogénesis, como lo describe Fierro (2005). Bolli *et al.* (2002) aportaron evidencias de que COX-2 posee un rol cardioprotector, observando que inhibidores específicos de esta isoenzima aumentan el riesgo de sufrir accidentes cardiovasculares. Wu *et al.* (2006) demostraron que COX-2 juega un papel importante en la angiogénesis inducida por VEGF a través de p38 y las vías de activación de la quinasa JNK, sugiriendo que el papel cardioprotector de la COX-2 puede ser, al menos en parte, a través de su actividad angiogénica.

Según Tegeder *et al.* (2001), el AAS al hidrolizarse en medio acuoso o al ser metabolizado por esterases genera ácido acético y ácido salicílico (AS). Este último también tiene efecto antiangiogénico pero su mecanismo de acción parece tener diferencias con el de AAS ya que no inhibe a COX.

Resultados concluyentes de la acción de AAS sobre la angiogénesis han sido demostrados por muchos investigadores en modelos tumorales como lo indican Zhang *et al.* (2013); sin embargo, a la fecha no se han descrito efectos antiangiogénicos en el miocardio sano. En el presente trabajo nos propusimos estudiar el posible efecto inhibitor de AAS sobre la expresión de VEGF-A y su receptor en cardiomiocito de pollo durante el desarrollo fetal, con el objeto de comprender el mecanismo por el cual AAS interfiere en la formación de vasos sanguíneos.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Aplicación de AAS y AS.** Se utilizaron 30 huevos de pollo de raza White Leghorn embrionados, incubados con aire humedecido en una cámara a 37 °C, para analizar la capacidad angiogénica, de acuerdo a lo descrito previamente por Córdova *et al.* (2016). Brevemente, a las 48 horas de incubación se perforó cada huevo y se extrajo aproximadamente 2 mL de albúmina con ayuda de una pipeta Pasteur. Se desinfectó la zona con una solución de alcohol yodado y

se tapó con cinta adhesiva. Luego se abrió a nivel dorsal una ventana de 2,5 cm de ancho por 2 cm de alto. Todo este proceso se hizo de manera estéril.

Se distribuyeron los huevos de manera aleatoria en tres grupos de 10 unidades cada uno. A los 8 días de incubación, se implantó en la membrana alantocoriónica (MAC) de cada uno, un filtro de metilcelulosa impregnado con fármacos disueltos en 60 µL de DMSO 0,1 %.

A las 48 horas post-aplicación de la solución a estudiar, se realizó una toracotomía para extraer el corazón de los fetos de pollo, previa disección de los vasos sanguíneos que se comunican con este órgano. Paralelamente, se extrajo trozos de MAC de cada huevo. Las muestras obtenidas fueron fijadas en formalina tamponada pH 7,0 al 10 % por 7 días. Luego se realizó el procesamiento histológico necesario para obtener cortes de 5 µm de espesor.

Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el protocolo de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### Cuantificación de la densidad micro vascular en la MAC.

Se contaron los vasos sanguíneos de cada membrana, mediante un microscopio óptico de acuerdo a lo descrito previamente Córdova *et al.* Del total de 10 membranas obtenidas por cada grupo, se analizaron 50 campos con un aumento de 400x (4 a 6 campos por membrana). El microscopio tiene incorporada una rejilla de 90.000 µm<sup>2</sup>, dividida en 100 secciones. Se analizaron 10 de estas secciones, lo que corresponde a 9000 µm<sup>2</sup> por cada campo. Dos examinadores realizaron recuento ciego, sin conocer el grupo al que pertenecía cada MAC. Los resultados se expresan como N° de vasos sanguíneos/9000 µm<sup>2</sup>.

**Cuantificación de VEGF-A y de VEGFR2.** Cortes seriados de miocardio de fetos de pollo, 5 cortes por cada corazón, previamente desparafinados e hidratados, fueron recuperados antigénicamente por incubación por 30 minutos en solución Dako Target Retrieval®. Luego fueron tratados con Peróxido de Hidrógeno al 3 % en Metanol por 10 minutos. Los cortes fueron incubados toda la noche a 4 °C con Anticuerpo anti VEGF-A (1:200) o con Anticuerpo anti VEGFR2 (1:200). Finalmente, fueron revelados usando el kit Histostain-Plus IHC Kit, HRP, Broad Spectrum® (Invitrogen, Camarillo, CA, USA). Los 5 cortes de cada corazón fueron visualizados a 400x en un microscopio óptico equipado con cámara Moticam 5000 y se cuantificó la inmunoreactividad en 50 imágenes por cada grupo experimental, mediante el programa Image-J (NIH, USA), según condiciones descritas previamente por Fernández *et al.* (2014). El recuento de cada dato-imagen fue normalizado,

calculando el nivel de expresión en cada imagen con respecto al promedio obtenido en las imágenes del grupo control.

**Análisis estadístico.** Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar. La comparación entre grupos experimentales se realizó por análisis de varianza (ANOVA), con prueba de Tukey mediante el software Graph Pad Prism 5. Se consideró diferencia significativa para valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

**Cuantificación de la densidad micro vascular en MAC.** La cantidad de vasos sanguíneos en membrana alantocoriónica fue diferente según el tratamiento recibido (Fig. 1a). Tanto en el grupo tratado con AS como en el tratado con AAS, la cantidad de vasos sanguíneos en  $9000 \mu\text{m}^2$  fue menor que en el grupo control ( $p = 0,0130$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente) (Fig. 1b). Comparando el efecto de ambos tratamientos, el de AAS fue mayor que el de AS ( $p = 0,0052$ ).

**Cuantificación de la expresión de VEGF-A.** La expresión de VEGF-A en el miocardio de fetos de pollo bajo el trata-

miento con AS y AAS, se muestra en la Figura 2. Se observa de manera homogénea la expresión de VEGF-A en los cardiomiocitos, a nivel citoplasmático (Fig. 2a). Para el grupo control, el nivel de expresión normalizada fue  $0,997 \pm 0,082$ . No encontramos efecto de ninguno de los tratamientos, al compararlos con el grupo control. En el grupo tratado con AS, se obtuvo un nivel de expresión de  $1,150 \pm 0,052$  y en el grupo tratado con AAS,  $0,921 \pm 0,053$ . Al comparar los dos tratamientos observamos que los cortes de miocardio de fetos tratados con AAS expresan menos VEGF-A que los de los tratados con AS ( $p = 0,001$ ) (Fig. 2b).

**Cuantificación de la expresión de VEGFR2.** El efecto del tratamiento con AS y AAS sobre los fetos de pollo en la expresión de VEGFR2 se muestra en la Figura 3. El patrón de expresión de VEGFR2 es homogéneo en el grupo control, mientras que en los grupos tratados con AS y AAS se observa una inmunoreactividad concentrada en ciertos grupos celulares (Fig. 3a). El valor normalizado para el grupo control fue de  $1,003 \pm 0,098$ . En el grupo tratado con AS, se obtuvo un nivel de expresión de  $0,853 \pm 0,060$  y en el grupo tratado con AAS,  $0,752 \pm 0,070$ . Dado esto, el tratamiento con AAS disminuyó la expresión de VEGFR2, ( $p = 0,0204$ ) mientras que el AS no tuvo efecto (Fig. 3b).

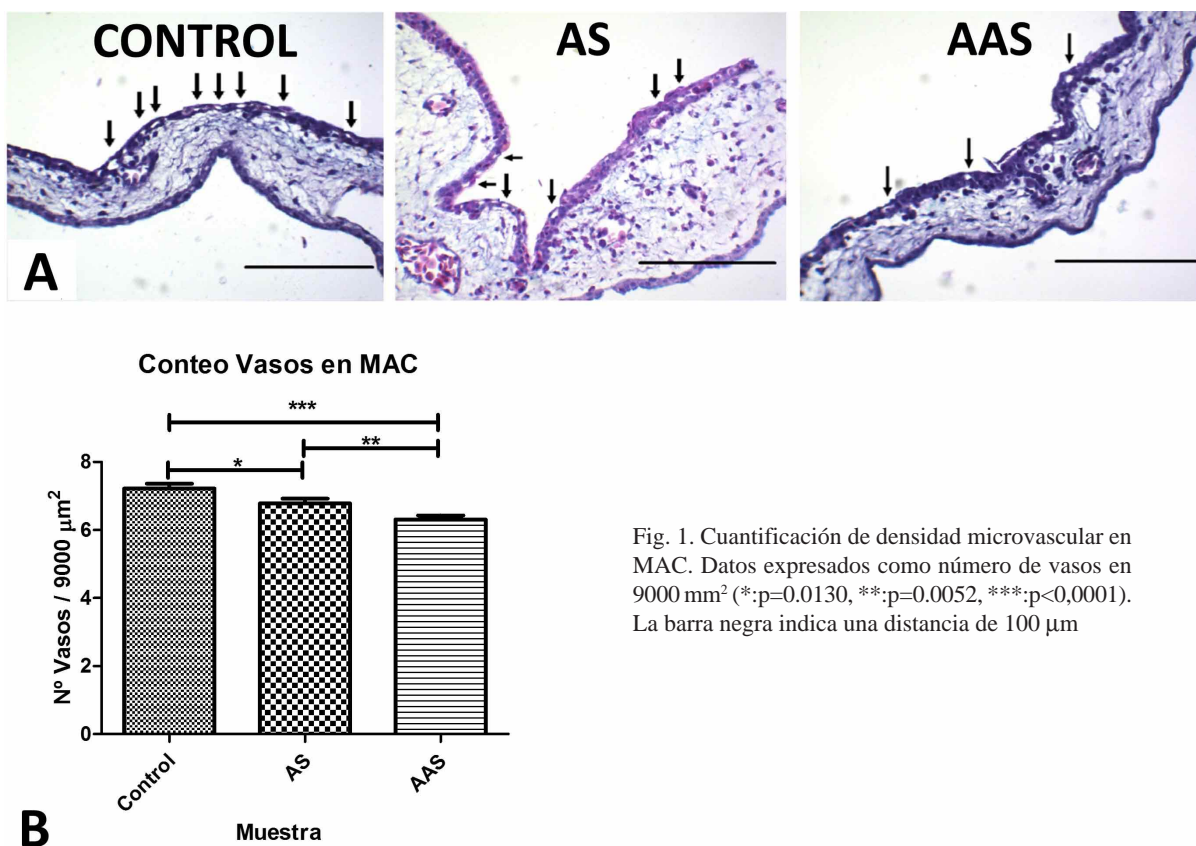
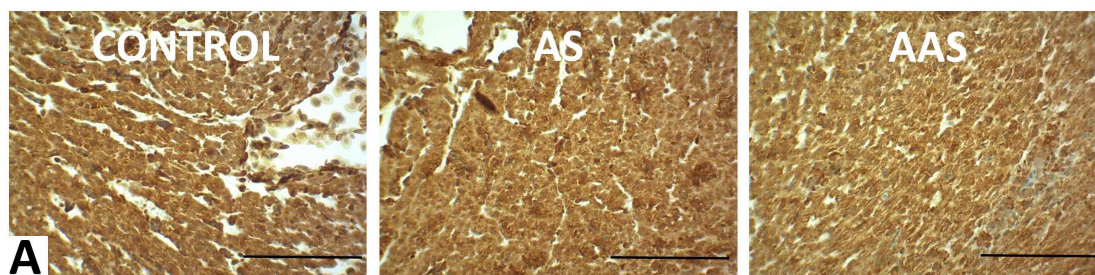
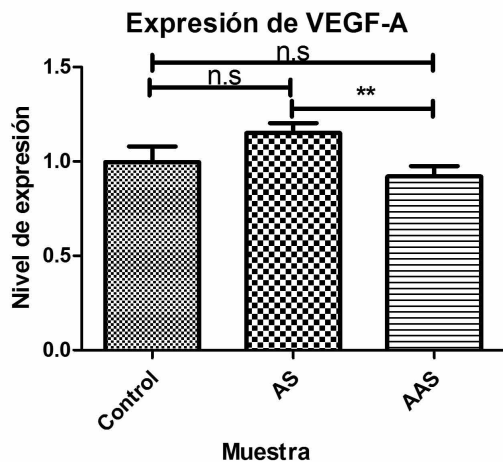


Fig. 1. Cuantificación de densidad microvascular en MAC. Datos expresados como número de vasos en  $9000 \text{ mm}^2$  (\*: $p = 0,0130$ , \*\*: $p = 0,0052$ , \*\*\*: $p < 0,0001$ ). La barra negra indica una distancia de  $100 \mu\text{m}$



**A**

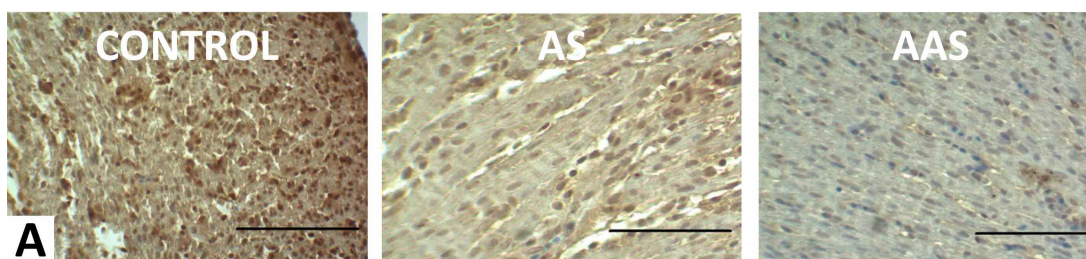


**B**

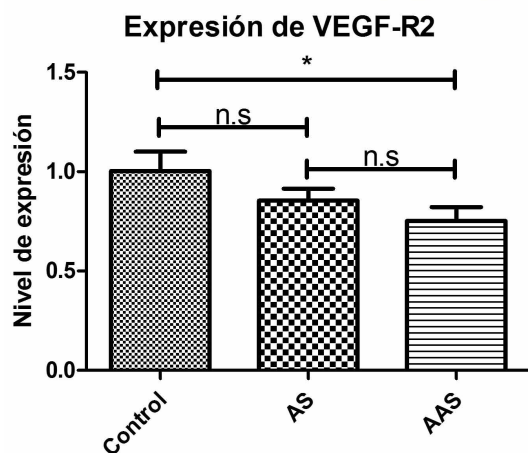
Fig. 2. Expresión de VEGF-A en miocardio de pollo.

A) Secciones representativas de miocardio de fetos de pollos de 12 días que muestran la presencia de VEGF-A mediante inmunohistoquímica. Las barras de cada imagen representan 100  $\mu$ m.

B) Cuantificación del nivel de expresión de VEGF-A. Los datos se normalizaron con respecto al grupo control, como se explica en Métodos. (ns: no hay diferencia entre grupos; \*\*:p=0.001).



**A**



**B**

Fig. 3. Expresión de VEGFR2 en miocardio de pollo

A) Secciones representativas de miocardio de fetos de pollos de 12 días que muestran la presencia de VEGFR2 mediante inmunohistoquímica. Las barras de cada imagen representan 100  $\mu$ m.

B) Cuantificación del nivel de expresión de VEGFR2. Los datos se normalizaron con respecto al grupo control, como se explica en Métodos. (ns: no hay diferencia entre grupos; \*p=0.0204)

## DISCUSIÓN

Propusimos que AAS disminuye la expresión de VEGF-A y de su receptor (VEGFR2), como un posible mecanismo por el cual ejerce su efecto antiangiogénico. Tanto AAS como AS mostraron tener un efecto inhibitorio sobre la angiogénesis, observado por la disminución de la densidad microvascular en la MAC de pollo. Adicionalmente, el AAS disminuyó la expresión de VEGFR2 en el miocardio de estos fetos, aunque no tuvo efecto sobre la expresión de su ligando, VEGF-A. Estos resultados sientan las bases para postular que la modulación de la expresión de VEGFR2 forma parte del mecanismo de acción del AAS sobre la inhibición de la angiogénesis.

La aplicación de 0,3  $\mu$ mol de AAS disminuyó la densidad microvascular en ensayo de MAC. Este efecto antiangiogénico de AAS está de acuerdo a lo reportado por nuestro grupo previamente por Córdova *et al.* y otros investigadores; Khan & Mehta muestran que AAS disminuye la proliferación de células endoteliales, evento crítico para la angiogénesis. ATL-1, análogo sintético de lipoxina A4, inhibe la adhesión de las células endoteliales, la actividad de las metaloproteinasas de matriz *in vitro* y además, la densidad vascular estudiada *in vivo* en un modelo murino de burbuja de aire subcutánea (air pouch) granulomatosa crónica, según lo descrito por Cezar-de-Mello *et al.* (2008) y Fierro *et al.* (2002). Por otra parte, Salvado *et al.* (2013) reportaron que AAS, al inhibir la síntesis de PGE2, inhibe la angiogénesis inducida por catelicidina LL-37, en células endoteliales humanas tanto *in vitro* como *in vivo*. Recientemente, Dai *et al.* (2017) observaron que AAS disminuye la angiogénesis tanto en embriones de pollo como en modelos tumorales y que este efecto es mediado por inhibición de la actividad enzimática de heparanasa. Esta enzima degrada al proteoglicano de cadenas de heparansulfato permitiendo una mayor disponibilidad de VEGF en el microambiente celular. Interesantemente, encontraron que AS y AAS inhiben a esta enzima en concentraciones similares. En su conjunto, estos hallazgos presentan evidencias de que AAS ejerce un efecto antiangiogénico al menos a través de dos mecanismos, uno de ellos independiente de COX.

No encontramos disminución de la expresión de VEGF-A en los cardiomiocitos de fetos de pollo como respuesta al tratamiento de 0,3  $\mu$ mol de AAS. Este resultado se suma a reportes contradictorios en relación a la inhibición de la expresión y actividad de VEGF mediada por este fármaco. AAS disminuye la expresión de VEGF-A en modelos de sarcoma según lo reportado por Zhang *et*

*al.* y también en hepatocarcinoma murino de acuerdo a lo descrito por Zhao *et al.* (2016). Sin embargo, Dai *et al.* muestran que AAS disminuye la liberación de VEGF sólo en algunas de las líneas tumorales que estudiaron. Más aún, Escribano *et al.* (2004) no observaron cambio en la concentración de VEGF en tejido colónico después de administración de AAS 10 mg/kg por 7 semanas.

La aplicación de 0,3  $\mu$ mol de AAS disminuyó la expresión de VEGFR2. Escribano *et al.* observaron que el tratamiento con AAS 10 mg/kg disminuye la expresión de VEGFR2. Sin duda, la disminución de la presencia de VEGFR2 debida a la acción de AAS aún en las dosis usadas en nuestro trabajo, permite postular que AAS ejerce un efecto antiangiogénico a través de una menor disponibilidad del receptor aun cuando no modifique los niveles del ligando. Esta evidencia apoya la idea de que AAS ejerce su rol antiangiogénico alterando más de un factor involucrado.

La aplicación de 0,3  $\mu$ mol de AS disminuye la densidad vascular en el ensayo de MAC de pollo, lo que concuerda con lo descrito previamente por nuestro grupo y otros investigadores. Borthwick *et al.* (2006), trabajando con cultivos de línea de células inmortalizadas, comprobaron que AS reduce la viabilidad celular y promueve la apoptosis de células endoteliales, además de reducir la ramificación de las formaciones tubulares. En nuestro estudio, AAS y AS tuvieron efecto similar sobre la densidad vascular y la concentración de VEGF; sin embargo, a diferencia de la acción inhibitoria de AAS en los niveles de VEGFR2, AS no tuvo efecto. Estos resultados nos permiten postular que AS podría ejercer su efecto antiangiogénico por una vía independiente de VEGFR2.

La administración de AAS post infarto al miocardio (IM) es el tratamiento convencional para prevenir la agregación plaquetaria. Nuestros resultados apuntan a que se estaría generando una contradicción fundamental al utilizar el AAS como antiagregante plaquetario, porque a su vez tiene un efecto antiangiogénico, dificultando la perfusión adecuada del tejido infartado. Esta idea se ve reafirmada por Chung *et al.* (2002) y Gerrah *et al.* (2004).

Por lo tanto, es necesario explorar alternativas terapéuticas que eviten la agregación plaquetaria luego de ocurrido un infarto, sin afectar el proceso de angiogénesis como lo reportan Smadja *et al.* (2012), que es tan necesario en este proceso. En conclusión, AAS disminuye los niveles de VEGFR2 en miocardio y la densidad microvascular en MAC de pollo. Estos resultados aportan al conocimiento del efecto antiangiogénico que posee el AAS en dosis farmacológicas, lo que podría tener implicancia en el tratamiento inicial post infarto.

**SEPÚLVEDA, F.; SAAVEDRA, E.; SÁNCHEZ, R.; CÓRDOVA, S.; LEMUS, D.; FUENZALIDA, M.; VERGARA, M. & ROSAS, C.** VEGF-A and VEGFR2 Expression in chicken myocardium treated with Acetylsalicylic Acid (AAS). *Int. J. Morphol.*, 37(1):48-53, 2019.

**SUMMARY:** The VEGF levels and its binding to its receptors are key stages in the regulation of angiogenesis. Acetylsalicylic acid (ASA), widely used in post-myocardial infarction treatment, has been shown to have an anti-angiogenic effect in tumor models. This potentially counterproductive effect requires to be studied in myocardium. The aim of this study is to quantify the effect of ASA and salicylic acid (SA) on the vascularization in chick allantochorionic membrane (CAM) and on the levels of VEGF-A and VEGFR2 in myocardium of chicken embryos. Thirty White Leghorn chicken fetuses were instilled at 10 days of gestation with 60 mL of 0.1 % DMSO (control) or also containing 0.3 mmol of ASA or SA. After 48 hours, CAM histological processing was performed to count blood vessels and heart tissue to quantify VEGF-A and VEGFR2 by immunohistochemistry. Immunoreactivity was quantified by Image J. Both ASA and SA decreased CAM microvascular density. In myocardium, AAS, although not SA, decreased the concentration of VEGFR2. There was no effect on VEGF-A. In our experimental model, chicken fetuses at 10 days of gestation, the inhibitory effect of ASA on angiogenesis in CAM were also observed. The decrease in VEGFR2 in cardiomyocytes suggests that ASA also affects angiogenesis in healthy myocardium, modifying the availability of the receptor to VEGF. These findings allow us to postulate that ASA could interfere with tissue regeneration, when it is required, as post myocardial infarction.

**KEY WORDS: Aspirin; Heart; VEGF receptor; Angiogenesis.**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bolli, R.; Shinmura, K.; Tang, X. L.; Kodani, E.; Xuan, Y. T.; Guo, Y. & Dawn, B. Discovery of a new function of cyclooxygenase (COX)-2: COX-2 is a cardioprotective protein that alleviates ischemia/reperfusion injury and mediates the late phase of preconditioning. *Cardiovasc. Res.*, 55(3):506-19, 2002.
- Borthwick, G. M.; Johnson, A. S.; Partington, M.; Burn, J.; Wilson, R. & Arthur, H. M. Therapeutic levels of aspirin and salicylate directly inhibit a model of angiogenesis through a Cox-independent mechanism. *FASEB J.*, 20(12):2009-16, 2006.
- Cezar-de-Mello, P. F.; Vieira, A. M.; Nascimento-Silva, V.; Villela, C. G.; Barja-Fidalgo, C. & Fierro, I. M. ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A4, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Br. J. Pharmacol.*, 153(5):956-65, 2008.
- Chung, N. A.; Lydak, C.; Belgore, F.; Blann, A. D. & Lip, G. Y. Angiogenesis in myocardial infarction. An acute or chronic process? *Eur. Heart J.*, 23(20):1604-8, 2002.
- Córdova, S.; Lemus, D.; Rosas, C. & Calderón, J. L. Ácido acetilsalicílico (AAS) inhibe angiogénesis en membrana alantocorionica de pollo (MAC). *Rev. Chil. Cardiol.*, 35(2):127-32, 2016.
- Dai, X.; Yan, J.; Fu, X.; Pan, Q.; Sun, D.; Xu, Y.; Wang, J.; Nie, L.; Tong, L.; Shen, A.; Zheng, M.; Huang, M.; Tan, M.; Liu, H.; Huang, X.; Ding, J. & Geng, M. Aspirin inhibits cancer metastasis and angiogenesis via targeting heparanase. *Clin. Cancer Res.*, 23(20):6267-78, 2017.
- Escribano, A.; Molero, L.; López-Farré, A.; Abarrategui, C.; Carrasco, C.; García-Mendez, A.; Manzarbeitia, F.; Martín, M. J.; Vázquez, M.; Sánchez-Fayos, P.; Rico, L. & Porres Cubero, J. C. Aspirin inhibits endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and Flk-1 (vascular endothelial growth factor receptor-2) prior to rat colon tumour development. *Clin. Sci. (Lond.)*, 106(1):83-91, 2004.
- Fernández, J. G.; Rodríguez, D. A.; Valenzuela, M.; Calderon, C.; Urzúa, U.; Munroe, D.; Rosas, C.; Lemus, D.; Díaz, N.; Wright, M. C.; Leyton, L.; Tapia, J. C. & Quest, A. F. Survivin expression promotes VEGF-induced tumor angiogenesis via PI3K/Akt enhanced b-catenin/Tcf-Lef dependent transcription. *Mol. Cancer*, 13:209, 2014.
- Fierro, I. M. Angiogenesis and lipoxins. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 73(3-4):271-5, 2005.
- Fierro, I. M.; Kutok, J. L. & Serhan, C. N. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A(4) and lipoxin A(4). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300(2):385-92, 2002.
- Gerrah, R.; Fogel, M. & Gilon, D. Aspirin decreases vascular endothelial growth factor release during myocardial ischemia. *Int. J. Cardiol.*, 94(1):25-9, 2004.
- Hoeben, A.; Landuyt, B.; Highley, M. S.; Wildiers, H.; Van Oosterom, A. T. & De Bruijn, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.*, 56(4):549-80, 2004.
- Khan, Q. & Mehta, J. L. Relevance of platelet-independent effects of aspirin to its salutary effect in atherosclerosis-related events. *J. Atheroscler. Thromb.*, 12(4):185-90, 2005.
- Meek, I. L.; Van de Laar, M. A. & Vonkeman, H. E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: an overview of cardiovascular risks. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3(7):2146-62, 2010.
- Molin, D. & Post, M. J. Therapeutic angiogenesis in the heart: protect and serve. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 7(2):158-63, 2007.
- Salvado, M. D.; Di Gennaro, A.; Lindbom, L.; Agerberth, B. & Haeggström, J. Z. Cathelicidin LL-37 induces angiogenesis via PGE2-EP3 signaling in endothelial cells, in vivo inhibition by aspirin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 33(8):1965-72, 2013.
- Smadja, D. M.; Bura, A.; Szymezak, J.; Blanchard, A.; Remones, V.; Azizi, M. & Gaussem, P. Effect of clopidogrel on circulating biomarkers of angiogenesis and endothelial activation. *J. Cardiol.*, 59(1):30-5, 2012.
- Tegeeder, I.; Pfeilschifter, J. & Geisslinger, G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.*, 15(12):2057-72, 2001.
- Wu, G.; Luo, J.; Rana, J. S.; Laham, R.; Sellke, F. W. & Li, J. Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.*, 69(2):512-9, 2006.
- Zhang, X.; Wang, Z.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Jia, Q.; Wu, L. & Zhang, W. Impact of acetylsalicylic acid on tumor angiogenesis and lymphangiogenesis through inhibition of VEGF signaling in a murine sarcoma model. *Oncol. Rep.*, 29(5):1907-13, 2013.
- Zhao, Q.; Wang, Z.; Wang, Z.; Wu, L. & Zhang, W. Aspirin may inhibit angiogenesis and induce autophagy by inhibiting mTOR signaling pathway in murine hepatocarcinoma and sarcoma models. *Oncol. Lett.*, 12(4):2804-10, 2016.

Dirección para correspondencia:

Dr. Carlos Rosas C.

Departamento de Ciencias Morfológicas

Fac. de Medicina y Ciencia

Universidad San Sebastián

Lota 2465

Santiago

CHILE

Email: carlos.rosas@uss.cl

Recibido : 23-07-2018

Aceptado : 16-10-2018