



Papel del inhibidor del ciclo celular p27 durante el remodelado vascular

V. Andrés y A. Díez-Juan

Laboratorio de Biología Vascular. Instituto de Biomedicina de Valencia. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Valencia.

RESUMEN

Las células de la pared arterial presentan normalmente una tasa de proliferación celular muy reducida. Sin embargo, la hiperplasia de células vasculares es una característica del remodelado vascular inducido por diversos estímulos fisiopatológicos (por ejemplo, neovascularización, arteriosclerosis y re-estenosis post-angioplastia). El avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan el crecimiento celular en la pared vascular puede facilitar el desarrollo de terapias anti-proliferativas para el tratamiento de la patología vascular obstructiva. En esta revisión se discuten estudios recientes que demuestran el papel de la proteína supresora de crecimiento p27 durante el remodelado vascular.

INTRODUCCIÓN

La arteriosclerosis y las enfermedades cardiovasculares asociadas (por ejemplo, infarto de miocardio e infarto cerebral) ocupan el primer lugar entre las causas de mortalidad y morbilidad en países industrializados, siendo su prevalencia significativamente superior en pacientes con insuficiencia renal grave en comparación con la población general. Se acepta que la arteriosclerosis es un complejo proceso inflamatorio de naturaleza multifactorial en el que intervienen varios tipos celulares¹. Diversos factores de riesgo cardiovascular —genéticos y modificables— desencadenan un proceso de disfunción endotelial que determina la adhesión de leucocitos a la pared arterial y su proliferación. Estas células liberan citoquinas que provocan una respuesta proliferativa y migratoria del miocito liso vascular (MLV) de la túnica media. Además, el MLV «activado» produce gran cantidad de componentes de la matriz extracelular que se acumulan en la placa ateromatosa. En la fase aguda de la enfermedad, la ruptura del ateroma y los procesos trombóticos ocasionan accidentes isquémicos agudos².

Si bien la derivación ortocoronaria y la angioplastia resultan inicialmente muy eficientes para la

revascularización de tejidos isquémicos, su eficacia a largo plazo se ve comprometida en un número elevado de pacientes. Así, el 25-40% de los pacientes que se someten a angioplastia sufren la re-oclusión (re-estenosis) de la arteria afectada, típicamente en un plazo de 2 a 12 meses¹. Se acepta que la proliferación celular excesiva en la pared arterial es un factor importante en la re-estenosis post-angioplastia y durante la oclusión arterial en pacientes sometidos a derivación ortocoronaria^{1,3}.

La proliferación celular en organismos eucariotas requiere la actividad de holoenzimas constituidos por una subunidad catalítica, denominada quinasa dependiente de ciclina (CDK, cyclin-dependent kinase), y una subunidad reguladora denominada ciclina⁴. Durante las diferentes fases del ciclo celular se fosforilan sustratos celulares gracias a la activación coordinada de diversos complejos CDK/ciclina. La actividad de los holoenzimas CDK/ciclina se inhibe por medio de su interacción con proteínas de la familia CKI, las cuales se clasifican en las subfamilias CIP/KIP (p21, p27 y p57) e INK4 (p15, p16, p18, p19)⁴. El balance neto entre los niveles de CDKs, ciclinas y CKIs constituye un importante mecanismo de control del ciclo celular.

p27 Y NEOVASCULARIZACIÓN

La formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) juega un papel clave durante diversos procesos fisiológicos y patológicos. Diversos estudios han demostrado la presencia de microvasos en la placa de ateroma humano⁵⁻⁸, observándose una neovascularización más prevalente en la neointima de arterias con mayor grado de estenosis y mayor incidencia de rotura del ateroma⁹. Zhang y cols. observaron la ausencia de microvasos en el 97% de ateromas coronarios humanos con una relación íntima/media inferior a 0,54, mientras que el 98% de las arterias con íntima/media superior a 0,54 mostraron neovascularización⁶. Utilizando un modelo de arteriosclerosis experimental, Moulton y cols.¹⁰ han demostrado que la administración de inhibidores del proceso de neovascularización (en-

dostatina y TNP-470) reduce significativamente el tamaño del ateroma. Estos estudios sugieren que la neovascularización de la placa ateromatosa puede jugar un papel determinante durante la patología de arteriosclerosis.

La neovascularización requiere el remodelado de la matriz extracelular y la proliferación y migración de células endoteliales. Estudios recientes de nuestro laboratorio sugieren que la CKI p27 es un inhibidor del proceso de neovascularización¹¹. Mediante la utilización de vectores adenovirales, demostramos que la sobreexpresión inducible de p27 inhibe significativamente la proliferación y migración de células endoteliales de cordón umbilical humano en cultivo. Además, la capacidad de estas células para formar estructuras tubulares sobre Matrigel disminuye en presencia de niveles elevados de p27. De acuerdo con estos resultados, la sobreexpresión inducible de p27 inhibió la recuperación del flujo sanguíneo y la formación de neocapilares en un modelo murino de isquemia quirúrgica.

p27 Y RE-ESTENOSIS

Se ha demostrado que el remodelado vascular en arterias sometidas a angioplastia se caracteriza por una fase inicial de proliferación del MLV, seguida del re-establecimiento del fenotipo quiescente en un plazo de tiempo variable, dependiendo del modelo animal (típicamente 2-4 semanas). Estudios recientes sugieren que p27 contribuye a este bloqueo proliferativo: 1) cultivos de MLVs quiescentes muestran un gran aumento de los niveles de p27 unida a CDK2, fenómeno que se asocia con la inhibición de la actividad CDK2, represión transcripcional del promotor de ciclina A e inhibición de la proliferación celular^{12,13}; 2) el retorno al estado quiescente del MLV en fases posteriores del remodelado vascular post-angioplastia se asocia con la inducción de p27, fenómeno que puede contribuir al cese de proliferación en estas células^{12,14}. De acuerdo con esta hipótesis, la terapia génica basada en la sobre-expresión de p27 mediante adenovirus recombinantes reduce el desarrollo de la lesión neointima en diversos modelos de angioplastia experimental^{12,15}. Lamphere y cols., han demostrado recientemente que proteínas quiméricas p27-p16 muestran una mayor actividad antiproliferativa en comparación con p27 y p16, sugiriendo su mayor eficacia en abordajes de terapia génica para el tratamiento de re-estenosis¹⁶.

El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) juega un papel clave en la proliferación inicial del MLV de la túnica media en las fases tempranas post-angioplastia¹⁷⁻¹⁹. Por el contrario, el tra-

tamiento con anticuerpos que neutralizan la acción de bFGF no inhibe la proliferación del MLV de la lesión neointima que se desarrolla en fases posteriores²⁰, y la infusión con bFGF sólo aumenta ligeramente la proliferación de MLVs presentes en la lesión^{17,19}. Esta respuesta proliferativa atenuada del MLV de la lesión ocurre a pesar de la activación robusta de la vía de señalización de MAPK y de la inducción de reguladores positivos del ciclo celular (por ejemplo, ciclina D, ciclina E, CDK2 y CDK4)¹⁹. La respuesta diferencial del MLV de la media y de la lesión se correlaciona con diferencias en los niveles de p27, de modo que su expresión es muy elevada en MLVs aislados a partir de lesión neointima en comparación con MLVs de la túnica media¹⁹. Además, la infusión de bFGF no reduce la expresión de p27 en arterias con lesiones establecidas¹⁹.

p27 y ARTERIOSCLEROSIS

La proliferación celular en la pared arterial se ha observado en todas las fases de desarrollo de la lesión arteriosclerótica^{1,21}, si bien estudios con conejos hiperlipidémicos han demostrado una correlación inversa entre el tamaño de la lesión y el índice de proliferación arterial²²⁻²⁴. Estos estudios sugieren que la respuesta proliferativa en la pared arterial ocurre fundamentalmente durante las fases iniciales del proceso aterogénico. Tanner y cols.¹⁴ han sugerido la existencia de una correlación inversa entre los niveles de p27 y la tasa de proliferación del MLV en ateroma humano. Ihling y cols.²⁵ también observaron expresión de p27 en lesiones ateromatosas humanas, sugiriendo que p27 puede jugar un papel importante en el efecto antiproliferativo del TGF- β_1 en la placa arteriosclerótica.

Los estudios anteriores sugieren la importancia de p27 en la regulación de la proliferación celular en el ateroma. Estudios recientes de nuestro laboratorio demuestran una relación causa-efecto entre p27 y la arteriosclerosis inducida por dieta hipercolesterolemia²⁶. Utilizamos en nuestro estudio ratones deficientes en p27, los cuales presentan un aumento de proliferación celular asociado con gigantismo e hiperplasia de diversos órganos²⁷⁻²⁹. Teniendo en cuenta que el ratón es poco susceptible al desarrollo de ateromas³⁰, cruzamos ratones deficientes en p27 y ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE) para obtener animales con diferentes dotaciones de p27 en un entorno de predisposición al desarrollo de ateromas. Estudios previos han demostrado que la ausencia de apoE en el ratón induce hipercolesterolemia y arteriosclerosis espontánea, proceso que se acelera con una dieta aterogénica³⁰. Los anima-

les carentes de p27 y con una dotación normal de apoE (apoE+/-p27^{-/-}) no desarrollaron hipercolesterolemia y no mostraron ateromas. Por el contrario, los tres grupos de ratones apoE^{-/-} desarrollaron una hipercolesterolemia severa, que no se vio afectada por la dotación de p27. En concordancia con numerosos estudios previos, la ausencia de apoE provocó la aparición de ateromas, principalmente en el cayado de la aorta. Los ratones apoE^{-/-} con uno o dos alelos de p27 inactivados (apoE^{-/-}p27^{+/-} y apoE^{-/-}p27^{-/-}, respectivamente) mostraron un aumento progresivo en la severidad del proceso aterogénico. En conjunto, estos estudios sugieren que el desencadenante de la arteriosclerosis es la hipercolesterolemia, lograda en este modelo animal mediante la inactivación de apoE, y no la ausencia de p27. Así, los ratones apoE+/-p27^{-/-} alimentados con la dieta aterogénica mantienen niveles normales de colesterol y no desarrollan arteriosclerosis. Sin embargo, la inactivación total de p27 en ratones hiperlipidémicos acelera significativamente el proceso aterogénico, observándose un fenotipo intermedio en ratones con un único alelo de p27 inactivo. Por medio de técnicas de inmunohistoquímica comprobamos que el aumento de arteriosclerosis en los ratones apoE^{-/-}p27^{-/-} se asocia con un incremento en la tasa de proliferación de macrófagos y MLVs. Estos estudios demuestran una relación causal entre el descenso en el nivel de expresión de p27 y el desarrollo de la placa de ateroma. Estudios futuros deberán investigar la pauta de expresión temporal y espacial de p27 en diferentes fases del desarrollo del ateroma, tanto en modelos de arteriosclerosis experimental como en tejido arterial humano.

BIBLIOGRAFÍA

- Ross R: Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126, 1999.
- Fuster V, Badimón L, Badimón JJ, Chesebro JH: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326: 242-250, 1992.
- Libby P, Tanaka H: The molecular basis of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* 40: 97-106, 1997.
- Graña X, Reddy EP: Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11: 211-219, 1995.
- Barger AC, Beeuwkes R, 3rd, Lainey LL, Silverman KJ: Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 310: 175-177, 1984.
- Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI, Higgins G: Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 143: 164-172, 1993.
- Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K: Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol* 26: 450-456, 1995.
- Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT: Mast cells accompany microvessels in human coronary atheromas: implications for intimal neovascularization and hemorrhage. *Atherosclerosis* 123: 123-131, 1996.
- Paterson JC: Capillary rupture with intimal hemorrhage as a causative factor in coronary thrombosis. *Arch Pathol* 25: 474-487, 1938.
- Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J: Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 99: 1726-1732, 1999.
- Goukassian D, Díez-Juan A, Asahara T, Schratzberger P, Silver M, Murayama T, Isner JM, Andrés V: Overexpression of p27^{Kip1} by doxycycline-regulated adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis. *FASEB J* 15: 1877-1885, 2001.
- Chen D, Krasinski K, Chen D, Sylvester A, Chen J, Nisen PD, Andrés V: Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27^{Kip1}, an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J Clin Invest* 99: 2334-2341, 1997.
- Sylvester AM, Chen D, Krasinski K, Andrés V: Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation. *J Clin Invest* 101: 940-948, 1998.
- Tanner FC, Yang Z-Y, Duckers E, Gordon D, Nabel GJ, Nabel EG: Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease. *Circ Res* 82: 396-403, 1998.
- Tanner FC, Boehm M, Akyürek LM, San H, Yang Z-Y, Tashiro J, Nabel GJ, Nabel EG: Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, and p16^{Ink4} on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 101: 2022-2025, 2000.
- Lamphere L, Tsui L, Wick S, Nakano T, Kilinski L, Finer M, McArthur J, Gyuris J: Novel chimeric p16 and p27 molecules with increased antiproliferative activity for vascular disease gene therapy. *J Mol Med* 78: 451-459, 2000.
- Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA: Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res* 68: 106-113, 1991.
- Lindner V, Reidy MA: Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3739-3743, 1991.
- Olson NE, Kozlowski J, Reidy MA: Proliferation of intimal smooth muscle cells. Attenuation of basic fibroblast growth factor 2-stimulated proliferation is associated with increased expression of cell cycle inhibitors. *J Biol Chem* 275: 11270-11277, 2000.
- Olson NE, Chao S, Lindner V, Reidy MA: Intimal smooth muscle cell proliferation after balloon catheter injury. The role of basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 140: 1017-23, 1992.
- Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809, 1993.
- Spraragen SC, Bond VP, Dahl LK: Role of hyperplasia in vascular lesions of cholesterol-fed rabbits studied with thymidine-3H autoradiography. *Circ Res* 11: 329-336, 1962.
- McMillan GC, Stary HC: Preliminary experience with mitotic activity of cellular elements in the atherosclerotic plaques of cholesterol-fed rabbits studied by labeling with tritiated thymidine. *Ann N Y Acad Sci* 149: 699-709, 1968.
- Rosenfeld ME, Ross R: Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 10: 680-687, 1990.

25. Ihling C, Technau K, Gross V, Schulte-Monting J, Zeiher AM, Schaefer HE: Concordant upregulation of type II-TGF-beta-receptor, the cyclin- dependent kinases inhibitor p27^{Kip1} and cyclin E in human atherosclerotic tissue: implications for lesion cellularity. *Atherosclerosis* 144: 7-14, 1999.
26. Díez-Juan A, Andrés V: The growth suppressor p27^{Kip1} protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB J* 15: 1989-1995, 2001.
27. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Plyak K, Tsai L-H, Broudy V, Perlmutter RM and others: a syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell* 85: 733-744, 1996.
28. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todovora KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A: Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. *Cell* 85: 721-732, 1996.
29. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K: Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85: 707-720, 1996.
30. Breslow JL: Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272: 685-688, 1996.