



II. REMODELADO VASCULAR Y ANGIOGÉNESIS EN EL SISTEMA CIRCULATORIO

Participación de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa/Akt/sintasa endotelial del óxido nítrico en procesos de angiogénesis y remodelado vascular

M. Morales Ruiz

Laboratorio Hormonal. Hospital Clínic Universitari. Universidad de Barcelona. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

El término angiogénesis engloba un conjunto de mecanismos biológicos dirigidos a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Existe una serie de etapas secuenciales que dirigen este proceso: liberación de proteasas sintetizadas en el endotelio, degradación de la membrana basal que rodea el vaso existente, migración de células endoteliales, proliferación endotelial, morfogénesis, inhibición de apoptosis, generación de nueva membrana basal, miogénesis vascular y, por último, remodelado vascular que dará lugar a un sistema vascular maduro¹⁻². La angiogénesis interviene en los procesos fisiológicos de reproducción y reparación tisular. Sin embargo, el desarrollo de la angiogénesis también puede acarrear diversas complicaciones patológicas, como por ejemplo, artrosis, neovascularización ocular, psoriasis, hemangiomas, etc. Finalmente, es bien conocido que el crecimiento tumoral y metastático son angiogénesis-dependiente³.

Los recientes descubrimientos sobre la influencia de factores de crecimiento en el desarrollo y maduración de la vasculatura han propiciado la búsqueda de nuevas terapias pro o anti-angiogénicas basadas en la administración de factores de crecimiento, o bien, de inhibidores angiogénicos. Aunque estas estrategias son prometedoras, es necesario un mayor y más profundo conocimiento de las bases moleculares que regulan y dirigen las diferentes etapas que engloba la angiogénesis, así como la caracterización de las vías de señalización que dirigen este fenómeno. Por lo tanto, el objetivo de esta revisión es resumir los últimos avances publicados sobre la participación de la vía de transducción de señal PI3-

quinasa/Akt/eNOS, en los procesos pro-angiogénicos de citoprotección, migración celular y remodelado vascular.

REGULACIÓN DE LOS PROCESOS ANGIOGÉNICOS A TRAVÉS DE LOS ENZIMAS FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASA (PI3-QUINASA), AKT Y SINTASA ENDOTELIAL DEL ÓXIDO NÍTRICO (eNOS)

Muchas rutas de transducción de señales convergen o regulan el enzima PI3-quinasa. Diferentes estímulos (p.ej: la activación de receptores del tipo tirosina quinasa, la activación de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G y la activación de la proteína Ras) pueden reclutar en membrana y activar a PI3-quinasa. Una vez activo, este enzima cataliza la fosforilación en la posición 3'-OH de los anillos porfirínicos de fosfatidilinositoles (PI) específicos, dando como productos de esta reacción fosfatidilinositol 3,4,-bisfosfato y fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Estos lípidos son potentes efectores reconocidos por proteínas que contienen dominios PH (*pleckstrin homology domains*), como es el caso del enzima serina/treonina quinasa PKB/Akt⁴. El dominio PH de Akt recluta a este enzima en la membrana mediante el reconocimiento de lípidos inositoles generados por la activación de PI3-quinasa. Este cambio de localización celular, permite que Akt sea fosforilado por enzimas de la familia PDKs (*phosphoinositide-dependent kinases*) en Tre-308 y Ser-473, activando de esta manera su actividad catalítica. El enzima Akt activado fosforila los aminoácidos serina o treonina de multitud de

proteínas que poseen la secuencia aminoacídica consenso RxRxxS/T en su estructura primaria; generando señales de citoprotección⁵.

Estudios recientes han demostrado que Akt fosforila a la eNOS en su residuo serina 1179 (en la secuencia bovina o serina 1177 en la secuencia humana), resultando en la activación de eNOS⁶⁻⁷. Este enzima cataliza la conversión de L-arginina y O₂ en citrulina y óxido nítrico, mayoritariamente. El óxido nítrico (NO) es uno de los reguladores más importantes del tono vascular que actúa, además, como mediador biológico en numerosas funciones fisiológicas, entre las que se encuentra la inducción de la angiogénesis. Estos hallazgos, junto con artículos que demuestran que la activación de Akt es necesaria en los procesos de angiogénesis inducidos por VEGF (*vascular endothelial growth factor*)⁸, indican que la vía Akt/eNOS es un componente necesario en la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Citoprotección

En células endoteliales vasculares el balance entre las señales de citoprotección y de apoptosis contribuye a procesos fisiológicos y fisiopatológicos como angiogénesis, homeostasis vascular y enfermedades isquémicas. Uno de los enzimas que controla un mayor número de elementos englobados dentro de la compleja maquinaria apoptótica es Akt. Esta proteína inhibe la apoptosis a través de su interacción con Bad, caspasa 9, factores de transcripción pertenecientes a la familia Forkhead y reguladores de NF- κ B (*nuclear factor-kappaB*) pertenecientes a la familia IKK (*IkappaB kinase*), cada uno de los cuales desempeña una función crítica en el control de muerte celular⁵. Recientemente se ha descrito otra nueva función antiapoptótica de Akt a través de la regulación negativa de la proteína p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*), la cual es un importante modulador del programa proapoptótico en las células endoteliales. Akt ejerce su actividad inhibitoria sobre p38 fosforilando e inhibiendo la proteína MEKK3 (*MAPK/ERK kinase kinase 3*), un activador del enzima p38⁹.

El NO es otro regulador importante de apoptosis. Aunque son bien conocidas las propiedades proapoptóticas de esta sustancia, existe un gran número de evidencias que indican que bajas concentraciones de NO, similares a las producidas en el endotelio en condiciones fisiológicas, actúan como estímulo citoprotector interfiriendo con vías de transducción de señal que controlan los procesos de apoptosis¹⁰. De todas las funciones citoprotectoras del NO, quizá la más relevante sea la inhibición

ejercida sobre caspasa-3 mediante S-nitrosilación de su residuo cisteína-163¹¹.

Estos datos indican que la activación de la vía PI3-quinasa/Akt/eNOS mediada por agentes angiogénicos como VEGF es un componente de citoprotección necesario en el mantenimiento de nuevas estructuras vasculares.

Migración celular

La quimiotaxis es un fenómeno complejo estimulado por ligandos extracelulares que actúan sobre receptores específicos (p.ej: receptores acoplados a proteína G o receptores tirosina quinasa). Algunos de los mecanismos implicados en este fenómeno son, la reorganización cortical de actina en el extremo dirigido hacia el gradiente quimiotáctico, polarización en la localización de moléculas de señalización, polimerización y despolimerización de filamentos de actina y ciclos de adhesión y desunión de la matriz extracelular¹²⁻¹³.

La migración de células endoteliales vasculares es un proceso crítico en angiogénesis, mediante el que nuevos vasos crecen en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Este proceso está controlado por numerosos factores angiogénicos, como NO¹⁴⁻¹⁵, VEGF¹⁶, bFGF (*basic fibroblast growth factor*)¹⁷ y lípidos bioactivos como SPP (*sphingosine-1-phosphate*)¹⁸. Recientemente se han definido algunos de los mecanismos moleculares por los cuales la vía PI3-quinasa/Akt/eNOS regula la migración celular inducida por VEGF y SPP.

VEGF es un factor de crecimiento angiogénico que actúa a través de la unión a receptores específicos de membrana del tipo tirosina quinasa, causando la activación de varias vías de señalización¹⁹, incluyendo PI3-quinasa/Akt y la consiguiente inducción de eNOS⁶⁻⁷. La activación de células endoteliales con VEGF estimula la reorganización de los filamentos de actina que dan lugar a estructuras especializadas, como por ejemplo, fibras de estrés y lamelipodios, necesarias durante el proceso de quimiotaxis. Evidencias directas obtenidas por Morales-Ruiz y cols.²⁰, mostraron que células endoteliales transducidas con un mutante dominante negativo de Akt no respondieron al estímulo quimiotáctico inducido por VEGF. Además, la acción ejercida por VEGF sobre la reorganización de los filamentos de actina fue completamente inhibida en las mismas condiciones experimentales. Adicionalmente, la supresión en la síntesis de NO en respuesta a la estimulación con VEGF abolió las propiedades quimiotácticas de este factor de crecimiento. Aunque en el contexto de migración celular los efectos de NO no están bien caracterizados,

esta sustancia podría favorecer el fenómeno de quimiotaxis influenciando el estado de fosforilación del enzima FAK (*focal adhesion kinase*)²¹, cuya actividad está relacionada con migración celular.

La vía PI3k/Akt/eNOS también participa en los efectos migratorios inducidos por SPP. Este lípido, un producto del metabolismo de esfingomielina, media su acción a través de la interacción con receptores de la familia EDG (*endothelial differentiation gene*) acoplados a proteína G. Diferentes enzimas son activados en respuesta a SPP, como por ejemplo ERK1/2 y las proteínas monoméricas GTPasas Rho y Rac relacionadas con la reorganización de filamentos de actina²². Recientemente se ha descrito la activación-Gi dependiente de la vía PI3-quinasa/Akt/eNOS mediada por SPP a través de su receptor EDG-1²³. Estos autores demostraron también que la regulación negativa de la PI3-quinasa inhibió la capacidad de SPP de inducir quimiotaxis. En relación con esta observación, estudios realizados por Lee M-J y cols.²⁴, demuestran que Akt fosforila al receptor EDG-1 en su residuo treonina 236, posibilitando de esta manera la respuesta quimiotáctica inducida por SPP. Además, la transactivación de EDG-1 mediada por Akt no es requerida para la transducción de señal Gi-dependiente pero si indispensable para la activación de la proteína Rac, reorganización cortical de actina e inducción de angiogénesis *in vitro* e *in vivo*.

En resumen, estos trabajos muestran una nueva propiedad de la multifuncional proteína quinasa-Akt que puede actuar como inductora de migración celular en respuesta a VEGF y SPP y, por lo tanto, como reguladora de angiogénesis.

NO y remodelado vascular

Los procesos anteriormente mencionados (citoprotección y migración celular) dependen exclusivamente de células endoteliales. El endotelio sólo puede iniciar, pero no completar angiogénesis. Por lo tanto, se tiene que considerar la participación de otros tipos celulares y mecanismos que posibiliten el desarrollo de una vasculatura funcional, como por ejemplo, el remodelado vascular.

Cambios crónicos en el flujo sanguíneo causan alteraciones en la arquitectura del vaso para normalizar el estrés de cizallamiento experimentado por el endotelio. De esta manera, un incremento del flujo sanguíneo está asociado a un incremento en el diámetro del lumen del vaso y, por el contrario, una disminución del flujo sanguíneo produce una reducción en el diámetro de los vasos arteriales. El endotelio que rodea el lumen, es el encargado de actuar como captador de estas fuerzas mecánicas y de

traducir estos eventos a señales bioquímicas que regularán el tono y la arquitectura vascular²⁵. Estudios con ratones mutantes nulos confirman que uno de los principales efectores endoteliales que interviene en el remodelado vascular es el NO. Recientemente, Rudic y cols.²⁶, desarrollaron un modelo experimental de remodelado vascular en ratón, en el que la ligadura de la arteria carótida externa izquierda durante dos semanas provocó una reducción en el diámetro del lumen de la arteria carótida común. Una observación interesante fue que la reducción en el diámetro del lumen, tras la ligadura de la carótida externa izquierda, no fue observada en ratones mutantes nulos para el gen eNOS. Además, la capa media de la arteria que recibió el estímulo de remodelado vascular presentó hiperplasia, en concordancia con la propiedad ya descrita del NO de actuar como un agente inhibidor de la proliferación de células musculares lisas²⁷.

Estos datos sugieren que un defecto primario en la síntesis de NO puede promover un remodelado anormal e inducir cambios fisiopatológicos en la arquitectura arterial asociados a cuadros clínicos complejos, como la hipertensión arterial y la aterosclerosis.

CONCLUSIONES

En este artículo solamente se ha revisado la implicación de la vía PI3-quinasa/Akt/eNOS en la angiogénesis, sin hacer referencia a la función angiogénica de otras vías ya bien descritas.

En resumen, los factores VEGF y SPP activan el enzima Akt a través de la acción de PI3-quinasa, cuya actividad es necesaria para inducir cambios en la organización cortical de actina y promover quimiotaxis en células endoteliales. Además, la activación de Akt se asocia a su vez con la activación de eNOS y el consiguiente aumento en la producción de NO. Esta inducción de óxido nítrico es necesaria en el mantenimiento de las propiedades quimiotácticas de VEGF, mientras que SPP induce migración celular de forma óxido nítrico-independiente. El NO, además, regula el tono y el remodelado vascular, permitiendo de esta manera el desarrollo de una vasculatura funcional. En conclusión, los estudios anteriormente descritos sugieren un modelo de acción de los enzimas, PI3-quinasa, Akt y eNOS en los mecanismos de desarrollo y mantenimiento de una vasculatura madura.

Durante los últimos años, los esfuerzos dirigidos a caracterizar las bases moleculares de la angiogénesis ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Sin embargo, aunque los actuales

conocimientos ya están siendo utilizando en estudios clínicos, es necesario una más completa caracterización de estos mecanismos reguladores para posibilitar el diseño de estrategias más efectivas y seguras. En el futuro, probablemente, estos esfuerzos permitirán el uso generalizado de la terapia angiogénica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000.
2. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997.
3. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31, 1995.
4. Wymann MP, Pirola L: Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436: 127-150, 1998.
5. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME: Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13: 2905-2927, 1999.
6. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B y cols.: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt- dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.
7. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ y cols.: Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601, 1999.
8. Papapetropoulos A, García-Cárdena G, Madrí JA, Sessa WC: Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100: 3131-3139, 1997.
9. Gratton JP, Morales-Ruiz M, Kureishi Y y cols.: Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 30359-30365, 2001.
10. Mannick JB, Miao XQ, Stamler JS: Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272: 24125-24128, 1997.
11. Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K y cols.: Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation *in vivo*. *J Biol Chem* 274: 6823-6826, 1999.
12. Schwarzbauer JE: Cell migration: may the force be with you. *Curr Biol* 7: R292-R294, 1997.
13. Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D: Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp* 65: 233-243, 1999.
14. Goligorsky MS, Noiri E, Peresleni T, Hu Y: Role of nitric oxide in cell adhesion and locomotion. *Exp Nephrol* 4: 314-321, 1996.
15. Ziche M, Morbidelli L, Masini E y cols.: Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration *in vitro* promoted by substance P. *J Clin Invest* 94: 2036-2044, 1994.
16. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269: 26988-26995, 1994.
17. Tsuboi R, Sato Y, Rifkin DB: Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J Cell Biol* 110: 511-517, 1990.
18. Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP y cols.: Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a Gi(i)- coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem* 274: 35343-35350, 1999.
19. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13: 18-32, 1992.
20. Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G y cols.: Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res* 86: 892-896, 2000.
21. Goligorsky MS, Abedi H, Noiri E y cols.: Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells. *Am J Physiol* 276: C1271-C1281, 1999.
22. Hla T, Lee MJ, Ancellin N y cols.: Sphingosine-1-phosphate signaling via the EDG-1 family of G-protein- coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci* 905: 16-24, 2000.
23. Morales-Ruiz M, Lee MJ, Zollner S y cols.: Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 19672-19677, 2001.
24. Lee MJ, Thangada S, Paik JH y cols.: Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol Cell* 8: 693-704, 2001.
25. Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75: 519-560, 1995.
26. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N y cols.: Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101: 731-736, 1998.
27. Guo K, Andrés V, Walsh K: Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 97: 2066-2072, 1998.