



# Óxido nítrico y degradación de la matriz extracelular, ¿un papel en la aterosclerosis?

E. López, S. Lamas y C. Zaragoza

Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Instituto «Reina Sofía» de Investigaciones Nefrológicas.

## INTRODUCCIÓN

El fenómeno de la remodelación vascular tiene lugar durante toda una serie de situaciones tanto fisiológicas como patológicas entre las que son precisas mencionar la angiogénesis, el daño vascular, o la aterosclerosis<sup>1-3</sup>. Un denominador común de todos estos procesos reside precisamente en la actividad migratoria del endotelio de los vasos, en la que un factor vasoactivo como es el óxido nítrico (NO) participa de forma significativa<sup>4</sup>.

Los enzimas encargados de la degradación de la matriz extracelular y por tanto implicados de forma directa con la remodelación vascular son las denominadas metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), cuya presencia es significativa en toda una serie de procesos tanto fisiológicos como patológicos, incluidos fenómenos de morfogénesis, desarrollo embrionario, remodelación vascular, ovulación, osificación, angiogénesis, reparación de heridas, artritis, artrosis, gingivitis, cáncer o aterosclerosis<sup>5</sup>.

En función del sustrato a degradar y su estructura, las MMPs se agrupan en colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), gelatinasas (MMP-2, MMP-9), estromelinas (MMP-3) y metaloproteinasas de tipo de membrana (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP), estas últimas implicadas en la activación de otras MMPs.

Desde su descubrimiento a mediados de los años 80 hasta la actualidad, es cada vez mayor el conocimiento sobre de las funciones que el NO ejerce en los seres vivos, hasta el punto de poder afirmar que es una de las biomoléculas cuya implicación es importante e incluso decisiva para el mantenimiento de la funcionalidad de toda una serie de aspectos biológicos. Concretamente, en el sistema cardiovascular el NO es crucial para el mantenimiento

del tono vascular como factor vasorrelajante del endotelio, interviene en el proceso inhibitorio de la agregación plaquetaria y se ha comprobado su capacidad pro-angiogénica<sup>6</sup>.

Nuestro grupo de trabajo ha puesto de manifiesto que en el endotelio de aorta el óxido nítrico es capaz de inducir tanto la expresión como la actividad de la metaloproteinasa de matriz extracelular MMP-13 (fig. 1)<sup>7,8</sup>, enzima implicada en la degradación de la matriz extracelular y especialmente involucrada en procesos migratorios de distintos

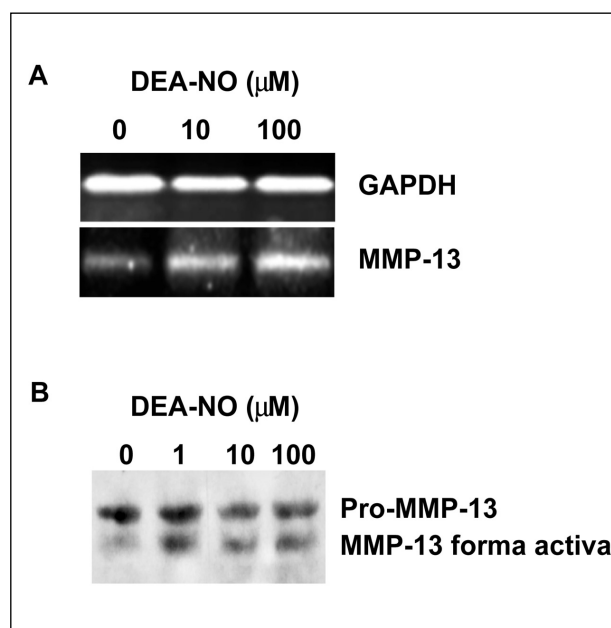


Fig. 1.—El NO induce la expresión y procesamiento de MMP-13 en BAEC. A. Ensayo de RT-PCR amplificando un fragmento de MMP-13 a partir de RNA total proveniente de BAEC estimuladas con concentraciones crecientes del donador de NO DEA-NO. Como gen control para determinar la variación de expresión génica se utilizó GAPDH. B. Detección de MMP-13 mediante Western blot a partir de lisados celulares provenientes de BAEC estimuladas con concentraciones crecientes de DEA-NO. MMP-13 se detectó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer tanto la forma pro-enzimática como la proteína activa.

tipos celulares durante procesos tales como la osificación, la metástasis, incluso la aterosclerosis<sup>9-13</sup>. En particular, el NO regula a través de la vía del GMP cíclico y de forma transcripcional la expresión génica de MMP-13, actuando sobre el elemento de respuesta a AP1 localizado en su región promotora, tal y como lo demuestran los ensayos de transfección en el endotelio del promotor salvaje de MMP-13 y un mutante en el sitio AP1, anclados al gen reportador de luciferasa. Tanto el análogo permeable del GMP cíclico 8Br-cGMP, como la sobre-expresión de un dominante positivo de la quinasa dependiente del GMP cíclico (PKG), enzima perteneciente a la ruta de señalización anteriormente mencionada, fueron capaces de estimular la actividad promotora de MMP-13 a través del sitio AP1 (fig. 2). Debido a este hallazgo hemos investigado la posibilidad de que el efecto del óxido nítrico en la remodelación de los vasos, y más concretamente en el proceso de la migración endotelial, sea precisamente a través del control de la presencia y actividad de MMPs, favoreciendo el movimiento del endotelio a través de la degradación de la matriz donde reside.

Con el objeto de profundizar en nuestra hipótesis hemos abordado el problema desarrollando un modelo de daño endotelial, en el cual tras practicar una incisión en una monocapa de células endoteliales de aorta bovina (BAEC) hemos monitorizado la capacidad del NO para ejercer un efecto sobre el movimiento celular a través del frente de la herida. Mediante el uso de este modelo hemos comprobado como el NO aportado de forma exógena mediante la adición DEA-NO y SNAP, o estimulada su producción endógena tras estimulación con bradiquina, induce tanto el movimiento del endotelio así como la acumulación de MMP-13 en el frente dañado (fig. 3). El mismo tipo de experimentación mediante el cultivo de endotelio de aorta proveniente de ratones deficientes para el gen productor de NO en el endotelio (eNOS), confirmó el retraso significativo en el movimiento celular al ser comparado con el de las células endoteliales provenientes de aortas de ratones de fenotipo salvaje para eNOS. Es además importante señalar que el endotelio de las aortas de los animales deficientes para eNOS presentan un descenso significativo en la cantidad de MMP-13 (fig. 3).

Con el objeto de profundizar en la base molecular por la que el NO ejerce este efecto, pudimos comprobar mediante técnicas de microscopía confocal e inmunoprecipitación que MMP-13 se localiza asociada a las membranas, en concreto en la región caveolar donde además de MMP-13 residen toda una serie de sistemas enzimáticos cuya

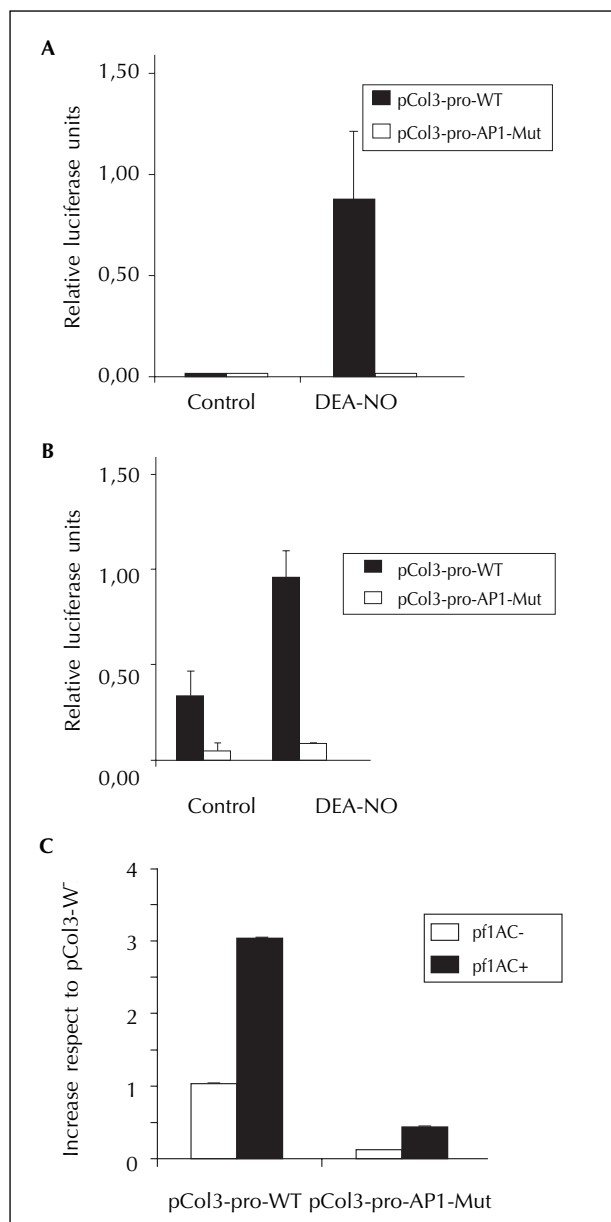


Fig. 2.—El NO a través de la vía del GMP cíclico, regula transcripcionalmente la expresión de MMP-13 a través del sitio AP1 del promotor. A. Las células BAEC fueron transfectadas de forma transitoria con una construcción que contiene el promotor de MMP-13 anclado a luciferasa (pCol3-pro-WT) y con otra construcción idéntica a la anterior conteniendo una mutación en el sitio de unión al factor de transcripción AP1 (pCol3-pro-API.Mut). Tras ser transfectadas, las células fueron estimuladas con DEA-NO (100  $\mu$ M) y la actividad luciférasa fue analizada por luminometría. B. Las células BAEC se transfectaron con las mismas construcciones que en A y posteriormente tratadas con el análogo del GMP cíclico 8Br-cGMP (100  $\mu$ M). C. Las células BAEC fueron transfectadas como en los casos anteriores y además fueron co-transfectadas con unas construcciones que expresan un dominante positivo de la quinasa dependiente del GMP cíclico (pI1AC).

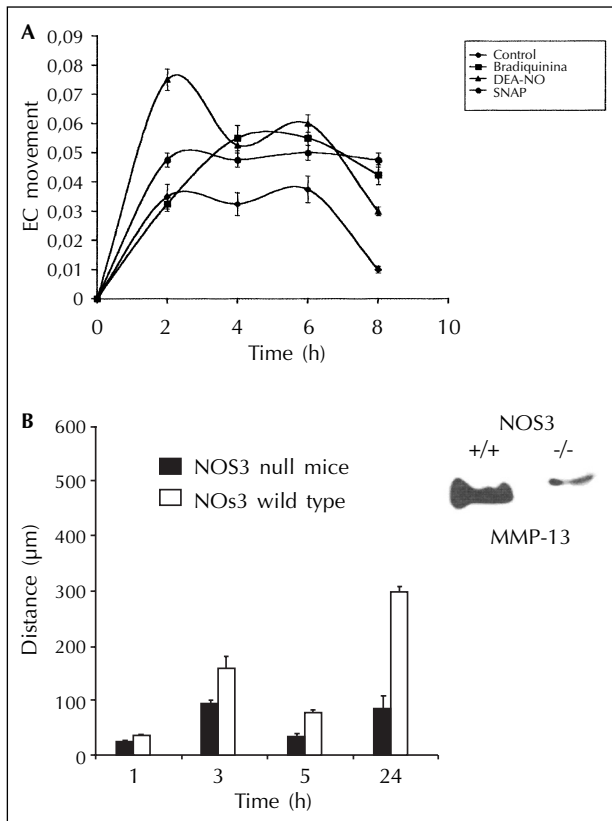


Fig. 3.—El NO induce el movimiento de las células endoteliales. A. Sobre una monocapa de BAEC se practicó una incisión y posteriormente se analizó el movimiento de las células estimuladas con los donadores de NO DEA-NO (100 µM), SNAP (100 µM) y con bradiquinina (0.1 µM) hacia el frente de la lesión. B. Igual que A partiendo de endotelio de aorta de ratones de fenotipo salvaje y deficiente para eNOS. El panel de la derecha es un análisis de Western blot en el que se detecta la presencia de MMP-13 en aortas de animales de fenotipo salvaje y deficiente para eNOS.

actividad es crucial para la señalización intracelular e intercelular (fig. 4). Nosotros postulamos que el mecanismo por el que el NO está ejerciendo un efecto pro-migratorio es al menos a través de la activación de MMP-13 en las caveolas, región donde se localiza MT1-MMP, metaloproteínasa descrita como activadora precisamente de MMP-13<sup>14,15</sup>.

Como anteriormente hemos mencionado, el NO tiene un claro poder pro-migratorio, aunque la base molecular del efecto ha sido investigada con poca profundidad. Nuestro grupo pone por primera vez de manifiesto una un mecanismo por el que el NO está controlando el efecto migratorio del endotelio de aorta, proceso crucial durante la remodelación de los vasos.

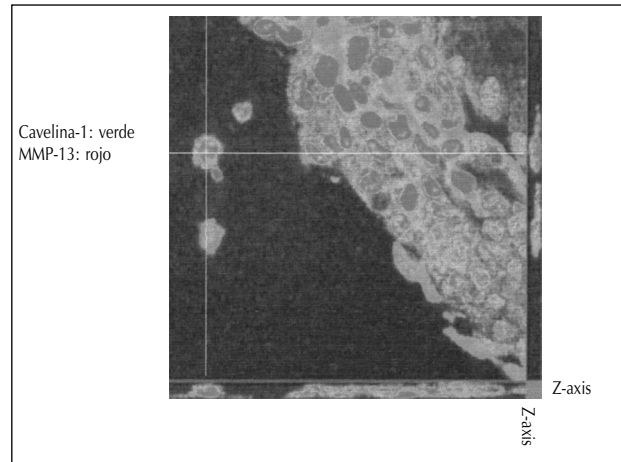


Fig. 4.—MMP-13 se localiza en las caveolas en el frente de la lesión. Tras realizar el daño endotelial se detectó la presencia de MMP-13 (rojo) y caveolina-1 (verde), proteína mayoritaria y marcador de caveolas, mediante microscopía confocal. Los ejes Z demuestran además de la co-localización de ambas enzimas, la distribución periférica de las mismas.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado con las siguientes fuentes de financiación:

- CZ: Ministerio de Ciencia y Tecnología SAF 2002-00399, Ministerio de Ciencia y Tecnología Programa Ramón y Cajal, Comunidad Autónoma de Madrid 08.4/0023/2003 1.
- SL y CZ: Ayuda de la Sociedad Española de Neurología, convocatoria 2001.

## BIBLIOGRAFÍA

- Xu Q: Biomechanical-stress-induced signaling and gene expression in the development of arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 10 (1): p. 35-41, 2000.
- Bundy RE y cols.: Transplant atherosclerosis: role of phenotypic modulation of vascular smooth muscle by nitric oxide. *Gen Pharmacol* 34(2): p. 73-84, 2000.
- Kurz H: Physiology of angiogenesis. *J Neurooncol* 50 (1-2): p. 17-35, 2000.
- Cooke JP: NO and angiogenesis. *Atheroscler (Supl.)* 4 (4): p. 53-60, 2003.
- Forget MA, Desrosiers RR, Beliveau R: Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacol* 77(7): p. 465-80, 1999.
- Ignarro LJ y cols.: Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34 (6): p. 879-86, 1999.
- Zaragoza C y cols.: Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-13 expression and activity in endothelium. *Kidney Int* 61 (3): p. 804-8, 2002.
- Zaragoza C y cols.: Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regu-

E. LÓPEZ y cols.

- lates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol* 62 (4): p. 927-35, 2002.
9. Selvamurugan N, Partridge NC: Constitutive expression and regulation of collagenase-3 in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 3 (4): p. 218-23, 2000.
  10. Uchida, M., y cols.: Transcriptional induction of matrix metalloproteinase-13 (collagenase- 3) by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 16 (2): p. 221-30, 2001.
  11. Pendas AM y cols.: An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies. *Clin Chim Acta* 291 (2): p. 137-55, 2000.
  12. D'Angelo M y cols.: MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy. *J Cell Biochem* 77 (4): p. 678-93, 2000.
  13. Yamagiwa H y cols.: Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25 (2): p. 197-203, 1999.
  14. Knauper V y cols.: Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996. 271 (29): p. 17124-31.
  15. Knauper V y cols.: Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271 (3): p. 1544-50, 1996.