

## Discusión



## 5 DISCUSION

### 5.1 Unión de las isoformas de PDGF a las diferentes especies de GAGs

Nuestros estudios de unión de las isoformas de PDGF en las células CHO K1 y en las hASMC indican que las isoformas largas de PDGF presentan mayor afinidad de unión a las células que las correspondientes isoformas cortas. Estos resultados también se confirman con los estudios de competición de la unión a la superficie celular en presencia de glicosaminoglicanos solubles (apartado 4.2.4) en los cuales la unión de las isoformas largas es mayormente inhibida por los GAGs que la de las isoformas cortas. Previos estudios de interacción de las isoformas de PDGF con LMWH demuestran que PDGF-AA<sub>L</sub> es la isoforma que presenta mayor afinidad de unión mientras que PDGF-BB<sub>L</sub> muestra diez veces menos afinidad. Las isoformas cortas PDGF-AA<sub>S</sub> y PDGF-BB<sub>S</sub> presentan una afinidad 100 veces menor que la del PDGF-AA<sub>L</sub> (Lustig et al. 1999). La secuencia de unión del PDGF-A codificada por el exón 6 presenta 18 aminoácidos con 10 residuos R y K (56%) mientras que la secuencia paralela de unión del PDGF-B presenta 53 aminoácidos con 15 residuos R y K distribuidos al azar (28%). La secuencia de aminoácidos básica codificada por el exón 6 del PDGF-A<sub>L</sub> y en especial los aminoácidos R<sup>111</sup>K<sup>116</sup>T<sup>125</sup> son críticos para la unión del PDGF-AA<sub>L</sub> a LMWH (Lustig et al. 1996, 1999). Además, la afinidad del heterodímero PDGF-AB con una cadena PDGF-A<sub>L</sub> y otra cadena PDGF-B<sub>S</sub> hacia el LMWH y la de los monómeros PDGF-A<sub>L</sub> y PDGF-B<sub>L</sub> es muy reducida respecto a la del PDGF-AA<sub>L</sub>; lo cual indica que es necesaria la presencia de las **dos secuencias básicas** para la unión a LMWH (Lustig et al. 1996). Se ha descrito una secuencia de aminoácidos básica similar (R<sup>120</sup>, K<sup>125</sup> y Q<sup>134</sup>) en el extremo C-terminal del bFGF (Thompson et al. 1994, Faham et al. 1996) y un motivo similar (K<sup>113</sup>, K<sup>118</sup>, Q<sup>127</sup>) en el aFGF (DiGabriele et al. 1998) que es esencial para la unión a heparina.

Además, nuestros estudios de unión de las isoformas de PDGF en los clones CHO y de colocalización en las hASMC muestran que las isoformas largas de PDGF se unen a heparán sulfatos y a condroitin sulfatos mientras que las isoformas cortas se unen mayormente a heparán sulfatos. Las células CHO junto con los tratamientos enzimáticos para eliminar HS o CS son un buen modelo para estudiar la interacción de los factores de crecimiento con los glicosaminoglicanos (Rapraeger, 2002). Así, las células CHO K1 (WT) presentan 40-70% de heparán sulfato y de 30-55% de condroitín sulfato en su superficie (Esko et al. 1985, 1987). Los clones mutantes utilizados: el clon CHO 745 (GAG<sup>-</sup>) es deficiente en la síntesis de GAG debido a una mutación en el enzima xilosiltransferasa (Esko et al. 1985, 1988) y el clon CHO 677 no presenta los enzimas N-acetilglucosaminiltransferasa y glucuroniltransferasa que son necesarios para la síntesis del HS y presenta 3-4 veces más CS que el clon CHO K1 (Esko et al. 1988, Lidholt et al. 1992). También observamos que las isoformas de PDGF-BB se unen en una proporción aproximada del 50% a otras proteínas de membrana en las células CHO. Estas proteínas podrían ser receptores de PDGF  $\alpha$  y  $\beta$  puesto que se han descrito en el clon CHO 677 y en el clon CHO K1 (Rolny et al. 2002) y probablemente también están presentes en las células CHO 745. Las isoformas de PDGF-BB pueden unirse a ambos receptores de PDGF  $\alpha$  y  $\beta$  mientras que las isoformas de PDGF-AA sólo se unen a los receptores de PDGF  $\alpha$ .

Las hASMC por su parte presentan mayoritariamente PGs de tipo HS y CS tanto en los PGs que son secretados como en los de la superficie (Fager et al. 1995). Además los PGs de tipo CS son de mayor peso molecular y son predominantemente secretados fuera de las células al contrario que los HS o DS. También se ha descrito que las hASMC que proliferan sintetizan el doble de PGs que las hASMC quiescentes (Fager et al. 1995). Estos resultados coinciden con nuestros estudios de inmunodetección de los HS y CS en las hASMC en los que se observa un patrón de marcaje de HS punteado y básicamente intracelular aunque también se observan marcaje en fibras de matriz extracelular asociadas a las células. El marcaje del CS en cambio es un punteado que se distribuye tanto fuera como dentro de las células y que se

concentra en los extremos de extensión de las células. Nuestro estudio de colocalización se enfocó en la unión de las isoformas de PDGF a las especies de GAGs mayoritarias e intracelulares, es decir los HS y CS. El patrón de marcaje intracelular es un punteado que podría corresponder a PGs de la familia de los sindecanos. Se ha descrito que los sindecanos -1, -2 y -4 se expresan en las células musculares lisas de las arterias carótidas de rata (Cizmeci-Smith 1992, 1993) y que la expresión del sindecano-1 y sindecano-4 aumenta en respuesta al daño vascular (Nikkari et al. 1994; Cizmeci-Smith et al. 1997). Otros PGs tales como el perlecano (HSPG), el versicano (CSPG) y el biglicano (DSPG) también aumentan sus niveles de mRNA en respuesta al daño vascular (Nikkari et al. 1994) o en células musculares lisas proliferantes (Tao et al. 1997).

Los sindecanos son HSPGs que presentan un dominio extracelular grande con cadenas de glicosaminoglicano unidas covalentemente, un único dominio transmembrana y un dominio citoplasmático intracelular muy pequeño (28-34 aminoácidos) (revisado en Carey, 1997; Tumova et al. 2000). Los cuatro sindecanos descritos varían en los dominios extracelulares pero presentan alta homología en el dominio transmembrana y en el dominio intracelular. El dominio intracelular contiene dos dominios conservados (C1 y C2) interrumpidos por una región variable que es específica de cada sindecano. Esto permite las interacciones específicas o comunes de la familia de los sindecanos entre la proteína núcleo y moléculas citoplasmáticas (Rapraeger y Ott, 1998). La mayoría de cadenas de GAG unidas a la proteína núcleo de los sindecanos son de heparán sulfato, aunque también el sindecano-1 y el sindecano-4 (ocasionalmente el sindecano-3) pueden presentar cadenas de condroitín sulfato.

Los sindecanos difieren en su expresión durante el desarrollo y en los tejidos del adulto. Así, el sindecano-1 está presente sobre todo en células epiteliales y en menor grado en células fibroblásticas. El sindecano-2 en cambio es abundante en fibroblastos. El sindecano-3 está presente en células neuronales mientras que el sindecano-4 es el más ubicuo y se localiza en los contactos focales de las células, entre ellas las células musculares lisas. Los sindecanos unen una variedad de proteínas de la matriz extracelular, moléculas de adhesión célula-célula, factores de crecimiento, lipoproteínas, lipoproteína lipasas, componentes de la coagulación sanguínea y por ello presentan un papel imprescindible en multitud de funciones celulares, entre ellas la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular, la proliferación, la migración, señalización de factores de crecimiento, metabolismo lipídico, etc. Una de las funciones de los sindecanos a resaltar en este estudio, es la unión a factores de crecimiento (factores de crecimiento con unión a heparina) tales como el bFGF, el aFGF, VEGF, EGF y el PDGF entre otros. En la matriz extracelular, los PGs retienen los factores de crecimiento que de esta manera son protegidos de la degradación proteolítica hasta que son liberados por una heparanasa para la interacción con sus receptores específicos (Vlodavsky et al. 1991, 1996). En la superficie celular, los PGs localizan y/o inmovilizan los factores de crecimiento para la unión a su receptor y consiguiente señalización (Sasisekharan et al. 1997, Faham, 1998; Gallagher, 1998). Además, los sindecanos estabilizan la unión del factor de crecimiento con su receptor, lo cual resulta en un aumento de la actividad del factor de crecimiento a bajas concentraciones (Carey, 1997). Existen distintos factores de crecimiento que presentan receptores específicos de tipo tirosina quinasa que se activan por dimerización (por ejemplo los de la familia del FGF, EGF, PDGF). En el caso del bFGF, se ha descrito que la unión a los sindecanos-1, -2 y -4 así como al glicano-1 potencia la dimerización y en consecuencia la activación de los receptores del bFGF (Steinfeld et al. 1996). Sin embargo, no todos los factores de crecimiento utilizan el mismo mecanismo. El HGF (factor de crecimiento de los hepatocitos) es un factor de crecimiento heterodimérico que se une a la heparina (con menor afinidad que el bFGF) y cuya actividad está incrementada por la presencia de HS pero no requiere de los HS para unirse a su receptor (Zioncheck et al. 1995).



En hASMC y en muchos otros tipos celulares, el mRNA de la isoforma PDGF-A<sub>L</sub> es minoritario respecto al de la isoforma PDGF-A<sub>S</sub> ya que representa un 5-10% del mRNA total de PDGF-A (Matoskova et al. 1989, Young et al. 1990). En células endoteliales de vena humana de adulto (hAVECs), el 40% del mRNA total de PDGF-A corresponde a la isoforma PDGF-A<sub>L</sub> y la diferenciación de monocitos a macrófagos provoca un incremento significativo en la cantidad de mRNA de la isoforma PDGF-A<sub>L</sub> (Krettek et al. 1997b). La expresión de mRNA del PDGF-B en las hASMC es 100 veces menor que la del PDGF-A mientras que en los macrófagos y en las hAVECs la expresión de ambas isoformas es elevada y similar (Krettek et al. 1997b). El PDGF-B se expresa como la isoforma PDGF-BB<sub>L</sub>, y la secuencia de retención está implicada en la translocación y retención en la membrana hasta que es proteolíticamente escindido para dar lugar a la isoforma PDGF-BB<sub>S</sub> (Östman et al. 1991, Heldin, 1992).

En consecuencia, las isoformas cortas a pesar de su menor afinidad de unión a las células, pueden unirse a los HS de la superficie celular si se alcanzan altas concentraciones. Como veremos más adelante en los estudios de proliferación y migración en las hASMC, las isoformas cortas presentan mayor actividad inductora de la proliferación y la migración en las hASMC que las correspondientes isoformas largas. Por tanto, la importancia fisiológica de la secuencia codificada por el exón 6 sería la interacción, inmovilización y acumulación de las isoformas largas de PDGF en los PGs de la membrana y de la matriz extracelular. Otra de las conclusiones importantes en este apartado, es que las isoformas largas también se pueden unir a condroitín sulfatos y que existe en las isoformas cortas otro dominio de interacción con heparán sulfatos aunque de menor afinidad que la secuencia básica codificada por el exón 6 (García-Olivas et al. 2003).

## 5.2 Mitogénesis y migración mediada por las isoformas de PDGF

Los resultados de los experimentos de síntesis de DNA y migración inducida por las isoformas de PDGF en las hASMC nos permiten concluir que la isoforma que produce mayor inducción de la mitogénesis y la migración en las hASMC es la PDGF-BB<sub>S</sub>. Hemos de tener en cuenta que la habilidad de la isoforma de PDGF para inducir mitogénesis y migración depende del tipo de isoforma de PDGF presente, de su concentración y de la cantidad de subunidades de receptor de PDGF expuestos por la célula. Tal como se describe en la Introducción (Figura 1.3), las isoformas PDGF-AA sólo pueden unirse al receptor  $\alpha\alpha$  mientras que las isoformas PDGF-BB pueden unirse a todos los dímeros posibles de receptor de PDGF:  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  y  $\alpha\beta$ . Ambos homodímeros  $\alpha\alpha$  y  $\beta\beta$  son potentes inductores de la síntesis de DNA (Koyama et al. 1992, 1994) mientras que la inducción de la quimiotaxis depende del tipo celular. El receptor heterodimérico  $\alpha\beta$  que puede unir las isoformas PDGF-BB y PDGF-AB presenta efectos incrementados de la inducción de la mitogénesis y de la quimiotaxis en comparación con los homodímeros; lo que se podría explicar por la autofosforilación en diferentes residuos de tirosina que los de los homodímeros. En muchos de los estudios citados a continuación no se detalla el tipo de isoforma de PDGF que se ha utilizado, sobre todo en cuanto a la isoforma PDGF-BB empleada en los experimentos. En muchos casos el PDGF es recombinante (en algunas referencias, el PDGF-BB recombinante es probablemente una mezcla entre el PDGF-BB<sub>L</sub> y PDGF-BB<sub>S</sub> (Kelly et al. 1993); o se trata básicamente de PDGF-BB<sub>S</sub> (Östman et al. 1991)) o comercial y a menos de que no se detalle el peso molecular, no se puede discernir de qué isoforma se trata. Presumiblemente, se trata de la isoforma PDGF-BB<sub>S</sub>, puesto que los efectos que se observan están muy incrementados respecto a los de las isoformas PDGF-AA.

Las células musculares lisas expresan 10 veces más el receptor  $\beta$  que el receptor  $\alpha$  (Raines et al. 1990, Bornfeldt et al. 1994, Heldin y Westermarck, 1996), por lo que probablemente ésta sea la causa de que el PDGF-BB sea un mayor inductor de la proliferación y de la migración que el PDGF-AA. Además, la expresión de los receptores es dependiente del fenotipo de las células musculares lisas. A nivel de mRNA, la expresión del receptor  $\beta$  es 100 veces menor que la expresión de receptor  $\alpha$ . Los niveles de mRNA del receptor  $\alpha$  son altos independientemente del fenotipo de las hASMC, mientras que los niveles de mRNA del

receptor  $\beta$  son mayores en las células quiescentes que en las células proliferantes o confluentes (Krettek et al. 1997a). Esto demuestra una regulación negativa del receptor  $\beta$  por parte de los factores de crecimiento presentes en el suero. A nivel proteico, se observa que las células quiescentes expresan 10 veces más el receptor  $\beta$  que el receptor  $\alpha$  (Hosang y Rouge, 1989; Ferns et al. 1990, Krettek et al. 1997a) y que la estimulación con suero produce una disminución general de todos los receptores de PDGF, en especial del receptor  $\alpha$  (Krettek et al. 1997a). Así, el suero regula negativamente tanto la transcripción de mRNA de los receptores  $\beta$  del PDGF así como la exposición de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  en la membrana de las células musculares lisas.

Previos experimentos de incorporación de timidina en células musculares lisas (Koyama et al. 1994, Krettek et al. 1997a) demuestran que la isoforma PDGF-BB presenta mayor inducción de la síntesis de DNA. Krettek et al. (1997a) además observó que no existían diferencias significativas entre la síntesis de DNA inducida por las dos isoformas PDGF-AA<sub>L</sub> y PDGF-AA<sub>S</sub>. En estos experimentos, Krettek et al. (1997a) encontró una síntesis basal de DNA en ausencia de factores de crecimiento que correspondía a un 10-30% del control positivo (activación con suero). Nosotros hemos encontrado esta activación basal en los experimentos de incorporación de timidina que se explicarían por la síntesis endógena de PDGF, principalmente de PDGF-AA<sub>S</sub> por parte de las células quiescentes (Krettek et al. 1997b).

Hemos observado también que la quimiotaxis (migración dirigida) en hASMC inducida por las isoformas PDGF-AA y PDGF-BB presenta el mismo modelo de activación que el de la síntesis de DNA. Existen diferentes estudios que demuestran que el receptor  $\alpha$  activa la quimiotaxis en diferentes tipos celulares (Hosang et al. 1989, Ferns et al. 1990, Shure et al. 1992, Uren et al. 1994, Osornio-Vargas et al. 1996, Yu et al. 2001) mientras que en otros estudios en células musculares lisas y en fibroblastos el receptor  $\alpha$  no sólo no induce sino que inhibe la quimiotaxis inducida por el receptor  $\beta$  (Nister et al. 1988, Eriksson et al. 1992, Koyama et al. 1992, 1994). Así, se ha demostrado que el PDGF-BB, pero no el PDGF-AA, estimula la fosforilación de la p125 FAK (*focal adhesión kinase*) y la tensina en las SMC activando la migración (Jiang et al. 1996). Estas diferencias se podrían explicar por la cantidad de receptores  $\alpha$  o  $\beta$  presentes en los distintos tipos celulares (Ferns et al. 1990), el tipo de ensayo (Rönstrand y Heldin, 2001) o la matriz extracelular (Koyama et al. 1998) utilizada en los experimentos de migración. También se ha descrito que la tripsinización afecta el número de receptores de PDGF de manera significativa (Bornfeldt et al. 1995).

La mayoría de estudios que han evaluado la quimiocinesis o migración al azar inducida por las isoformas de PDGF en células musculares lisas (Koyama et al. 1994, Clunn et al. 1997) o en macrófagos (Krettek et al. 2001) utilizan el sistema “*checkerboard*” en el cual añaden las isoformas de PDGF en el compartimiento superior o en ambos compartimientos superior e inferior de los *transwells* o cámaras Boyden a diferencia de los experimentos de quimiotaxis en los cuales añaden el factor quimiotáctico únicamente en el compartimiento inferior. Posteriormente, cuantifican el número de células migradas en las diferentes condiciones como medida de la quimiocinesis o de la quimiotaxis. Nosotros hemos realizado experimentos de “*time-lapse*” en células sembradas sobre placas para hacer un seguimiento del movimiento al azar de las células 20h después de la adición de las diferentes isoformas de PDGF en las placas y seguidamente hemos analizado este movimiento por *software*. Nuestros resultados demuestran que la migración basal es mínima tanto en las células no estimuladas como en las células estimuladas con las isoformas de PDGF. Sólo pudimos observar una estimulación de la quimiocinesis en las células en las que se había añadido el medio completo que presenta suero (Figura 4.21 y Figura 4.22). Sin embargo, también pudimos notar que la matriz de colágeno-I incrementaba la quimiocinesis basal y la inducida por todos los factores de crecimiento. Este incremento de quimiocinesis era aún más evidente para el caso de la estimulación con la isoforma PDGF-BB<sub>S</sub> y con los factores presentes en el suero. Se ha descrito que la migración de SMC inducida por PDGF-BB en una matriz de colágeno-I es un proceso que está mediado por integrinas  $\alpha 2\beta 1$  (Skinner et al. 1994).

Las integrinas son receptores de la matriz extracelular y sirven de unión entre las proteínas de la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina. Las integrinas están compuestas por la unión de una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . Las células musculares lisas expresan  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 5$  (revisado en Moiseeva, 2001). La subunidad  $\beta 1$  es la más predominante y forma complejos con todas las subunidades  $\alpha$ . Las subunidades  $\beta 3$  y  $\beta 5$  sólo forman complejos con la subunidad  $\alpha v$ . La expresión de las integrinas puede variar en las SMC *in vivo* respecto a las células cultivadas. Las integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha 3\beta 1$  están implicadas en la adhesión al colágeno. La subunidad  $\beta 1$  presenta un papel importante en la migración de las SMCs *in vitro*, especialmente los complejos  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 7\beta 1$  (Skinner et al. 1994, Yao et al. 1997, Ikari et al. 2000). Se ha descrito un aumento en la quimiotaxis de las SMC inducida por el PDGF-BB en células que habían incrementado la proporción de integrinas  $\alpha 2\beta 1$  en respuesta al FGF-2 (Pickering et al. 1997). Las integrinas  $\alpha v\beta 3$  también están implicadas en la migración de las SMC tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha descrito que las integrinas  $\alpha v\beta 3$  pero no las integrinas  $\alpha v\beta 5$  median la migración de las SMC en matrices de vitronectina y osteopontina (Liaw et al. 1995, Baron et al. 2000). En células endoteliales y en fibroblastos murinos, el PDGF-BB induce la migración de las células en una matriz de vitronectina a través de la asociación entre las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y el receptor  $\beta$  de PDGF (Woodard et al. 1998).

Las diferentes matrices extracelulares producen un cambio en el fenotipo de las células musculares lisas. Cuando las células musculares lisas de la media son puestas en cultivo, pasan del fenotipo "contráctil" al fenotipo "sintético" (apartado 1.4.2), es decir que pierden sus miofilamentos y desarrollan el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi, de forma similar a lo que ocurre en las lesiones ateroscleróticas. La laminina, que es un constituyente de la capa media, mantiene el fenotipo contráctil de las SMC mientras que la fibronectina promueve el cambio al fenotipo sintético (Hedin et al. 1988). La osteopontina y la vitronectina promueven la migración de las SMC como hemos citado anteriormente (Liaw et al. 1995, Slepian et al. 1998). Las células cultivadas en colágeno-I también presentan el fenotipo contráctil (Koyama et al. 1996b, Raines et al. 2000) y las células cultivadas en colágeno-IV reproducen el fenotipo de las SMC de la capa media *in vivo* (Hirose et al. 1999). De esta manera, la matriz extracelular que está alrededor de las SMC puede determinar si las células permanecen quiescentes o si migran y proliferan en respuesta a factores de crecimiento. Veremos más adelante que los cambios en la matriz extracelular que tienen lugar en la aterosclerosis promueven el cambio de fenotipo de las SMC.

Existen numerosas evidencias de que la degradación del colágeno-I es importante para inducir la migración en las SMC. En la aterosclerosis y restenosis, la degradación del colágeno-I tiene lugar por la acción de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Experimentos *in vitro* demuestran que la proteólisis del colágeno-I genera motivos RGD de unión a las integrinas (Davis et al. 1992, Montgomery et al. 1994). La fragmentación del colágeno-I por acción de la colagenasa-3 da lugar a un fragmento que activa la migración de SMC inducida por el PDGF-BB, en un proceso en el que intervienen las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y el receptor  $\beta$  de PDGF (Stringa et al. 2000).

En nuestros experimentos de quimioquinesis, es importante resaltar que la adición de los factores de crecimiento (PDGF o suero) se realizó en el mismo medio en el cual se habían mantenido quiescentes las células. El efecto inductor de la quimioquinesis no se observó cuando los factores de crecimiento se añadían en medio nuevo. El hecho de extraer el medio para marcar las células con CMFDA induce la desadhesión de muchas células mientras que la adición del medio en el que se habían mantenido quiescentes promueve de nuevo el "spreading" o extensión de las células. Estas observaciones implican la existencia de otro factor secretado por las células como por ejemplo alguna proteína de la matriz extracelular, colágeno fragmentado, MMP o factor de crecimiento como el PDGF que activen la quimioquinesis inducida por el PDGF-BB<sub>s</sub> y los factores presentes en el suero. Se ha observado que la fibronectina sintetizada por las SMC aumenta la migración de las células inducida por el PDGF-BB a través de una matriz de colágeno-I fragmentado (Stringa et al. 2002).

### 5.3 Interacciones entre el PDGF y los glicosaminoglicanos en la aterosclerosis

En las lesiones ateroscleróticas humanas se observa un incremento de las isoformas PDGF-AB y PDGF-BB y también un incremento del receptor  $\beta$  del PDGF en las células musculares lisas, lo cual nos permite concluir que el PDGF-BB tiene un papel más importante que el PDGF-AA en el desarrollo de la aterosclerosis (Rubin et al. 1988; Ross et al. 1990). De acuerdo con nuestros resultados, la isoforma PDGF-BB<sub>S</sub> es la principal promotora de la proliferación y migración de las células musculares lisas.

Por otro lado, las hASMC que proliferan sintetizan el doble de PGs que las células que se encuentran en estado de quiescencia (Fager et al. 1995). Más específicamente, la expresión de los HS de superficie: los sindecanos-1 y -4 y de matriz extracelular: perlecano se ve aumentada en la lesión vascular (Nikkari et al. 1994; Cizmeci-Smith et al. 1997). *In vivo*, se observa un aumento en la síntesis de GAGs en los primeros 7 días tras la angioplastia y un retorno a los niveles normales a los 14 días de la lesión (Richardson y Hatton, 1993). Los HS de la aorta humana también se ven modificados con la edad, teniendo lugar un incremento en la secuencia de los GAGs que unen al PDGF-AA<sub>L</sub> y al PDGF-BB<sub>L</sub>: **Ido-A (2-O-SO<sub>3</sub>)- GlcNSO<sub>3</sub> (6-O- SO<sub>3</sub>)-** (Feyzi et al. 1998). Esta secuencia sería la responsable de la retención de las isoformas largas de PDGF. La angioplastia de las arterias permite que las células dañadas liberen proteasas o heparinasas que liberan el PDGF retenido en los PGs de la superficie o de la matriz extracelular (Saksela y Rifkin, 1990, Godder et al. 1991).

Los cambios en la composición de los PGs no solamente afectan la unión del PDGF a las células sino que también intervienen negativa o positivamente en la proliferación y migración de las SMC. Los HS producidos por las SMC se han descrito como importantes inhibidores de la proliferación de las SMC (Fritze et al. 1985, Bingley et al. 1998). El PDGF-AA aumenta la síntesis de sindecano-1 en las SMC regulando negativamente la migración inducida por el PDGF-BB (Koyama et al. 1998). Igualmente, el perlecano aumenta su expresión en la neoíntima donde inhibe la proliferación inducida por el PDGF-BB (Kinsella et al. 2003). El “shedding” de los sindecanos puede regular el efecto inhibitorio de la migración producido por los sindecanos. Se ha descrito que los sindecanos liberados de la membrana aumentan la migración *in vitro* de las SMC (Higashiyama et al. 1993, Noda-Heiny y Sobel, 1995). Hay evidencias de la degradación de HS y CS debido a la acción de las MMPs y de la heparinasas en los primeros estadios de la lesión vascular (Fitzgerald et al. 1999). El tratamiento con heparinasas del ectodominio liberado del sindecano-1 genera fragmentos de HS que aumentan la actividad del FGF (Kato et al. 1998). En este contexto, hemos de tener en cuenta también los cambios en las proteínas de la matriz extracelular que se producen en las arterias en la lesión vascular.

La matriz extracelular que se encuentra alrededor de las SMC de la capa media normal es muy diferente a la matriz extracelular de las lesiones ateroscleróticas (Tabla 5.1). Como se puede observar, aparecen fibrillas de fibronectina en la superficie de las SMC durante los primeros estadios de desarrollo de la aterosclerosis y la restenosis (Kakolyris et al. 1995, Thyberg et al. 1997) mientras que desaparece la laminina. La fibronectina promueve el fenotipo sintético mientras que la laminina promueve el fenotipo contráctil de las SMC. También se observa en la matriz extracelular de las lesiones ateroscleróticas la presencia de osteopontina y vitronectina que promueven la adhesión y la migración de las SMC. También se observan otras glicoproteínas (SPARC, trombospondina y tenascina-C) que tienen propiedades anti-adhesivas (Sage y Bornstein, 1991).

PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	Capa media normal	Aterosclerosis
Colágeno tipo I, III y V	+	+
Colágeno tipo IV	+	+
Colágeno tipo VI	+	+
Colágeno tipo VIII	-	+
Laminina	+	-
Fibronectina	-	+
Osteopontina	-	+
Vitronectina	-	+
SPARC, tenascina-C y trombospondina	-	+

Tabla 5.1. Proteínas de la matriz extracelular presentes en la capa media normal de las arterias y en la aterosclerosis (Adaptado de Raines et al. 2000).

Los macrófagos infiltrados y las células musculares lisas activadas incrementan la expresión de metaloproteinasas de la matriz (MMPs; Galis et al. 1994, Halpert et al. 1996, Nikkari et al. 1996, Sukhova et al. 1999) y de las catepsinas (Sukhova et al. 1998) que pueden contribuir a la fragmentación de la matriz extracelular en la aterogénesis. La expresión de MMPs es especialmente elevada en los extremos y núcleo de la lesión, lo cual contribuye a la desestabilización de la placa. En las arterias normales, algunas de estas proteasas se expresan constitutivamente; sin embargo el control de su activación o inhibición por parte de los inhibidores de MMPs permite que presenten muy poca actividad. En las lesiones ateroscleróticas o restenóticas, el balance entre las proteasas y sus inhibidores está desequilibrado por la inducción de MMPs y por la activación de sus inhibidores (TIMPs). Las pro-MMPs pueden activarse *in vivo* por proteasas tales como la plasmina, trombina y otras MMPs. Se ha observado una degradación y fragmentación incrementada de las fibras de colágeno y de la elastina en las enfermedades vasculares. Así, se observa colágeno-I fragmentado en las lesiones que presentan macrófagos que son positivos para el MMP-1 y MMP-13 (colagenasas) (Sukhova et al. 1999). Se ha descrito también la inducción de dos gelatinasas: MMP-2 y MMP-9 en modelos de restenosis en diferentes especies animales. Existen diferentes evidencias de la actividad de las proteasas en la inducción de la migración de las SMC, ya que la inhibición de las MMPs impide la migración de las SMC (Bendeck et al. 1996) y la sobreexpresión de MMP-2 aumenta la migración de las SMC de arteria carótida de rata (Mason et al. 1999). Se ha descrito que la migración de las SMC de aorta inducida por PDGF-BB es dependiente de las MMP-2 y MMP-9 (Kenagy et al. 1997).

La proliferación de las células musculares lisas es mínima en las arterias normales mientras que en la aterosclerosis se observan focos de células musculares lisas que proliferan en la neointima y en la parte más interna de la media adyacente a la neointima (Rekhter y Gordon et al. 1995). Estos bajos niveles de proliferación en condiciones normales se correlacionan con la presencia de colágeno-I de tipo fibrilar puesto que promueven el fenotipo quiescente o contráctil de las SMC y mantienen su fenotipo diferenciado. En cambio, el colágeno-I fragmentado por la acción de las MMPs a través de la señalización mediada por las integrinas  $\alpha 1\beta 2$  y  $\alpha v\beta 1$  promueven la pérdida de los contactos focales y producen la desadhesión de las células (Carragher et al. 1999). Las SMC cultivadas en presencia de monómeros de colágeno-I presentan las características de las SMC de las lesiones ateroscleróticas. Además, se ha descrito que los monómeros de colágeno-I inducen la proliferación de las SMC en respuesta al PDGF (Koyama et al. 1996b). En consecuencia, la matriz extracelular de los vasos sanguíneos en condiciones normales no permite la proliferación de las SMC y la degradación de esta matriz extracelular es necesaria para inducir la proliferación y migración de las SMC en la aterosclerosis.

### 5.4 Efecto de la heparina en la mitogénesis y quimiotaxis

Nuestros resultados demuestran que la heparina inhibe de forma parcial y dependiente de concentración la mitogénesis y la quimiotaxis de las hASMC inducida por los factores de crecimiento presentes en el suero. Previos estudios con las hASMC, demuestran que la heparina, el dermatán sulfato y el heparán sulfato pero no el condroitín sulfato son capaces de inhibir de una manera dosis dependiente la incorporación de timidina inducida por los factores de crecimiento presentes en el suero (Fager et al. 1995). La heparina en presencia de suero impide la entrada de las hASMC en la fase S del ciclo celular ya que se une e inactiva reversiblemente los factores de crecimiento presentes en el suero, entre ellos el PDGF (Fager et al. 1992a y 1992b). La heparina también puede ejercer su efecto antiproliferativo a partir de la activación de distintas cascadas de señalización (Pukac et al. 1997, Kazi et al. 2002) que detienen el ciclo celular en la transición  $G_0/G_1$  (Castellot et al. 1982) o en la progresión de la fase  $G_1$  (Reilly et al. 1989); aunque el mecanismo no se conoce con detalle. Se ha descrito además que la heparina es endocitada en las células musculares lisas (Castellot et al. 1985) aunque se desconoce si la internalización de la heparina es necesaria para ejercer su efecto antiproliferativo.

Existe mucha discrepancia en los distintos estudios en los que se ha utilizado la heparina como inhibidor de la proliferación y migración de las SMC. Los heparán sulfatos producidos por las SMC (Fritze et al. 1985) se han utilizado como potentes inhibidores de la proliferación de las SMC y los heparán sulfatos aislados de arterias de distintas especies animales impiden la formación de la neointima que aparece tras la lesión en la carótida (Bingley 1997, 1998). La adición de heparitinasa presenta el mismo efecto *in vivo* (Silver et al. 1998). También se ha descrito que la adición de miméticos de HS o heparina/fragmentos de HS impiden la proliferación de las SMC (Castellot et al. 1986, Schmidt et al. 1992, Benezra et al. 1994, Garg et al. 2000). Hay evidencias de que la heparina puede inhibir la síntesis de DNA (Pukac et al. 1997) y la migración (Pukac et al. 1998) de las SMC inducida por el PDGF-BB. En el modelo de restenosis de rata, la heparina disminuye el engrosamiento de la neointima por inhibición de la proliferación y migración de las SMC (Clowes y Clowes, 1986). Sin embargo, en el modelo de restenosis de babuino, la heparina no es capaz de inhibir el engrosamiento de la neointima (Geary et al. 1995). Además, se ha descrito que la heparina puede inhibir la migración y proliferación de las SMC en cultivo inducida por los factores del suero pero no la inducida por el PDGF-BB. En SMC de rata, la heparina ni ninguna de sus formas modificadas puede inhibir la proliferación inducida por el PDGF-BB (Kazi et al. 2002). Además, muchos tratamientos clínicos con la heparina en humanos no reducen la incidencia de la restenosis (Ellis et al. 1989, Laskey et al. 1990, Faxon et al. 1994, Gimple et al. 1999).

Por otro lado, nosotros hemos observado que la heparina puede inhibir la migración de las hASMC inducida por el PDGF-BB<sub>S</sub> y que inhibición es dosis dependiente. Estos resultados se confirman con otros en los que también se observa una inhibición de la heparina dependiente de la concentración y reversible sobre la migración de SMC inducida por el FCS y el PDGF-BB (Kohno et al. 1998). La mayoría de estudios de la inhibición de la heparina sobre la proliferación /migración de las SMC inducida por el PDGF se han realizado sobre la isoforma BB, que es la que en general, produce mayor efecto en las SMC. Refson et al. (1995) observó que la heparina era capaz de inhibir la incorporación de timidina en SMC de una manera dosis dependiente cuando PDGF-AA se utilizó como mitógeno, y era incapaz de inhibir la incorporación de timidina inducida por las isoformas PDGF-AB o PDGF-BB.

La heparina y también los GAGs solubles utilizados para inhibir la unión a la superficie celular o la proliferación inducida por las isoformas de PDGF presentan un efecto inhibitor o no inhibitor dependiendo de la concentración de GAG utilizado y de la isoforma de PDGF utilizada (Tabla 4.2 y Figura 4.15). Así, se observa por ejemplo en la Tabla 4.2 que el inhibidor (ya sea heparina u otro GAG soluble), presenta un efecto inhibitor a bajas concentraciones mientras que no se observa inhibición a altas concentraciones. Una posible explicación sería la unión monovalente del PDGF cuando hay un exceso de GAG soluble. A bajas concentraciones de

inhibidor, el PDGF puede interactuar fácilmente con el inhibidor que de esta manera interfiere en la unión a los GAGs de la membrana o al receptor de alta afinidad. A altas concentraciones del GAG soluble, el PDGF se une de forma monovalente impidiendo la interacción con el inhibidor. Se desconoce también el mecanismo por el cual una misma concentración de inhibidor puede inhibir o activar la unión a la superficie de distintos factores de crecimiento o la respuesta celular originada por los factores de crecimiento.

### **5.5 Otros inhibidores de la mitogénesis: el clorato sódico y el $\beta$ -xilósido**

Dado que nuestros resultados indican que la heparina produce muy poca inhibición de la síntesis de DNA inducida por las isoformas de PDGF; utilizamos el clorato sódico como inhibidor de la sulfatación de los GAGs y el  $\beta$ -xilósido como inhibidor de la síntesis de GAGs para evaluar el papel de los GAGs en la activación de la síntesis de DNA inducida por las isoformas de PDGF. El tratamiento con clorato sódico es un método comúnmente utilizado para bloquear la unión de los factores de crecimiento a los GAGs de las células y de esta manera estudiar el efecto en las vías de señalización (fosforilación del receptor, activación de MAPK, fosforilación de PLC $\gamma$ , etc) que inducen la proliferación y/o migración (Rapraeger, 2002). El clorato sódico se utiliza normalmente a una concentración de 10-50 mM dependiendo del tipo celular y se realiza un pretratamiento de 24-48h antes de la adición del factor de crecimiento. Nosotros realizamos un pretratamiento de 24h antes de la adición de las isoformas de PDGF y evaluamos la inhibición de la incorporación de timidina a dos concentraciones de clorato sódico: 10 mM y 30 mM. El clorato sódico a una concentración de 10 mM produce poca inhibición de la mitogénesis inducida por el PDGF o por el S-BM mientras que una concentración de 30 mM es un importante inhibidor de la mitogénesis inducida por las isoformas de PDGF o el S-BM (Figura 4.16).

El tratamiento con metilumbeliferil- $\beta$ -xilósido se realizó 12h antes y durante la incubación con los factores de crecimiento para bloquear la biosíntesis de glicosaminoglicanos ya que el metilumbeliferil- $\beta$ -xilósido es un falso sustrato de la  $\beta$ -xilosidasa que interviene en la síntesis de los GAGs. Observamos que el  $\beta$ -xilósido inhibe en aproximadamente un 95% la síntesis de DNA inducida por las isoformas de PDGF o los factores del suero (Figura 4.16). Estudiamos también la citotoxicidad del clorato sódico y del  $\beta$ -xilósido para descartar cualquier efecto citotóxico de estos compuestos en las células. Así, estos resultados de los tratamientos con clorato sódico y  $\beta$ -xilósido sugieren la importancia de los GAGs en la activación de la mitogénesis de las hASMC inducida por las isoformas de PDGF y por los factores de crecimiento del suero.

### **5.6 Importancia de los glicosaminoglicanos en la actividad del PDGF**

Hemos visto que las isoformas cortas y en especial la isoforma PDGF-BB<sub>S</sub> presenta mayor activación de la mitogénesis y de la migración en las hASMC. Hemos observado también que las isoformas cortas se unen con menor afinidad a las células CHO y hASMC y que se unen principalmente a heparán sulfatos. Se ha descrito que la isoforma PDGF-AA<sub>S</sub> presenta mayor afinidad por el receptor  $\alpha$  de PDGF que la isoforma PDGF-AA<sub>L</sub> y que por tanto presenta mayores efectos en las células (Östman et al. 1989). Además, en fibroblastos tratados con clorato sódico se puede inducir la síntesis de DNA mediada por PDGF-BB pero no por bFGF, lo cual indica que la sulfatación de los GAGs no es esencial para la actividad del PDGF-BB (Rapraeger et al. 1991). La afinidad de las isoformas de PDGF a sus receptores es muy alta ( $K_d$ s de  $10^{-10}$  a  $10^{-9}$ ) mientras que la afinidad del exón 6 del PDGF a la superficie celular o a la matriz es baja ( $K_d$ s de  $10^{-6}$ ) (Heldin et al. 1988). En el caso del bFGF, la unión de baja afinidad a los proteoglicanos es necesaria para la actividad del factor de crecimiento, aunque éste no parece ser el caso del PDGF. Estos resultados sugieren que los GAGs no son necesarios para la activación de los receptores específicos de PDGF y que la secuencia codificada por el exón

6 que está presente en las isoformas largas de PDGF es importante para la retención de las isoformas de PDGF en los proteoglicanos de la membrana y de la matriz extracelular.

Hay sin embargo evidencias del papel de los glicosaminoglicanos en la función del PDGF. Se ha descrito que fragmentos de proteínas tales como la fibronectina (Chon y Chaikof, 2001) y de la apolipoproteína E (Swertfeger y Hui, 2001) que se unen a la heparina modulan negativamente la quimioquinesis inducida por el PDGF-AB y la proliferación inducida por el PDGF-BB respectivamente. Koyama et al. (1998) demostró que PDGF-AA induce su papel inhibitorio de la quimiotaxis de SMC mediada por el PDGF-BB a través de heparán sulfatos en una matriz de fibronectina pero no de colágeno-I.

Rolny et al. (2002) demostró que la heparina (y fragmentos de HS) amplifican la señal del PDGF-BB<sub>S</sub> a través del receptor  $\alpha$  pero no  $\beta$  en células CHO deficientes en heparán sulfatos (clon CHO 677). La señalización en las CHO 677 inducida por el PDGF-BB<sub>S</sub> y la heparina a través del receptor  $\alpha$  activa la quimiotaxis en éstas células. Sin embargo, la heparina no tiene ningún efecto en la activación del receptor  $\alpha$  mediada por el PDGF-AA. Se ha descrito que el PDGF-AA y el PDGF-BB se unen con distintas afinidades e inducen diferentes cambios de conformación en el dominio extracelular del receptor  $\alpha$  (Mahadevan et al. 1995). En estos experimentos, se utilizó una concentración muy baja de heparina (100 ng/ml) mientras que una concentración superior (1-5  $\mu$ g/ml) no presentaba este efecto. No obstante, se ha de tener en cuenta que la heparina amplifica pero no es absolutamente necesaria para la activación del receptor  $\alpha$  mediada por el PDGF-BB<sub>S</sub>.

Se desconoce si la heparina o los HS pueden interactuar directamente con los receptores de PDGF, como en el caso del FGF y sus receptores (Guimond et al. 1993, Gao y Goldfarb, 1995, Plotnikov et al. 1999, Loo et al. 2001). El receptor de FGF, FGFR-1 presenta en su dominio extracelular una secuencia de residuos básica a través de la cual interacciona con la heparina (Kan et al. 1993). Existe una secuencia similar a la del receptor FGFR-1 en el receptor  $\alpha$  del PDGF pero que no se ha encontrado en el receptor  $\beta$  (Rolny et al. 2002). La unión de la heparina o de los fragmentos de HS podrían cambiar la conformación del PDGF-BB<sub>S</sub> para activar la interacción del PDGF-BB<sub>S</sub> con el receptor  $\alpha$  pero no con el receptor  $\beta$ . Otra posibilidad es que la heparina cambie la conformación del receptor  $\alpha$  incrementando de esta manera la interacción con el PDGF-BB<sub>S</sub>. Por otro lado, también existe la posibilidad de que la heparina actúe de puente entre el PDGF-BB<sub>S</sub> y el receptor  $\alpha$ . Esto explicaría porqué la heparina a altas concentraciones no estimula la activación del receptor  $\alpha$  a través del PDGF-BB<sub>S</sub>, puesto que la probabilidad de que una única cadena de heparina pueda unir a la vez el PDGF-BB<sub>S</sub> y el receptor  $\alpha$  es muy baja.