

Introducción

1 INTRODUCCION

1.1 EI PDGF

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un mitógeno para fibroblastos, células musculares lisas (*smooth muscle cells, SMC*) y otros tipos celulares. Se aisló originariamente de los gránulos α de las plaquetas pero diferentes tipos celulares pueden sintetizarlo (revisión Heldin y Westermark, 1999).

Tipo celular	PDGF-A	PDGF-B
Fibroblastos	+	+
Queratinocitos	+	+
Células Leydig	+	+
Células mesangiales del riñón	+	+
Mioblastos	+	
Células musculares lisas	+	+
Células endoteliales	+	+
Astrocitos	+	
Neuronas	+	+
Células Schwann	+	+
Oocito, blastocisto	+	
Endometrio / miometrio (útero)	+	+
Células epiteliales mamarias	+	+
Células del epitelio pigmentario (retina)	+	+
Macrófagos	+	+
Plaquetas / megacariocitos	+	+

Tabla 1.1. Tipos celulares que expresan PDGF (Heldin y Westermark, 1999).

El PDGF es una familia de isoformas diméricas unidas por puentes disulfuro, que pueden presentarse en forma de homodímeros o de heterodímeros. Tradicionalmente sólo se conocían dos cadenas polipeptídicas: A- y B- que formaban homodímeros o heterodímeros. La mayoría de los tipos celulares expresan las cadenas A- y B- (Tabla 1.1), aunque la expresión de las dos cadenas está regulada independientemente a nivel transcripcional y post-transcripcional (revisado en Dirks y Bloemers, 1996). Las formas maduras de las cadenas A- y B- tienen aproximadamente 100 aminoácidos y presentan un 60% de identidad en la secuencia de aminoácidos. Estas formas presentan 8 residuos de cisteína que están implicados en el mantenimiento de la estructura secundaria y terciaria; elementos que también se observan en miembros de la familia del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). La estructura tridimensional del PDGF-BB también presenta semejanza con la del TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) y con el NGF (factor de crecimiento neuronal) a pesar de no presentar similitud en la secuencia de aminoácidos.

Recientemente se han descrito dos nuevas cadenas polipeptídicas que sólo forman homodímeros: C- y D- (Heldin et al. 2002; Li y Eriksson, 2003). Estas nuevas cadenas presentan residuos de cisteína adicionales y además presentan un dominio N- terminal CUB que necesita ser eliminado para que las formas PDGF-C y -D sean activas.

1.1.1 Biosíntesis del PDGF

Los genes para las cadenas A- y B- del PDGF están localizados en los cromosomas 7 y 22 respectivamente. Están organizados de una forma similar, con 7 exones. El exón 6 contiene una secuencia COOH terminal que es eliminada en el proceso de maduración de la cadena B-. La cadena A- puede estar presente en dos formas según “*splicing*” alternativo: con y sin la secuencia codificada por el exón 6; dando lugar a dos posibles isoformas: la PDGF-A larga (PDGF-A_L) y la PDGF-A corta (PDGF-A_S) respectivamente. Ambas cadenas del PDGF A- y B- se sintetizan como moléculas precursoras que experimentan proteólisis en el extremo NH₂ terminal y en el caso de la cadena B- también se produce proteólisis del extremo COOH. De este modo, la isoforma precursora PDGF-B larga (PDGF-B_L) que contiene el exón 6 generaría la isoforma PDGF-B corta (PDGF-B_S).

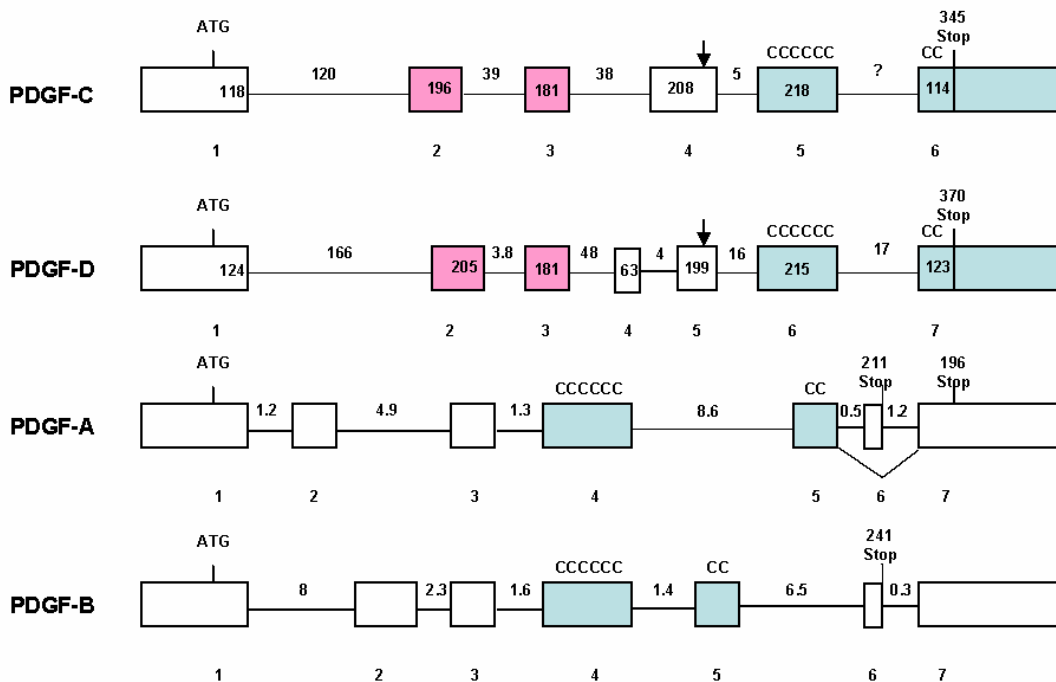


Figura 1.1. Estructuras genómicas de los 4 genes de PDGF. Los exones se indican en forma de cajas con el número total de pares de bases (bp) dentro de la caja. Los intrones se indican como líneas uniendo los exones con el número de bases (kb) encima de las líneas. También se indican los codones de inicio (ATG), de STOP y la longitud del polipéptido (nº de residuos de aminoácidos) encima del codón STOP. Las flechas muestran los hipotéticos sitios de rotura proteolítica del PDGF-C y del PDGF-D. El PDGF-A presenta “*splicing*” alternativo por lo que se muestran dos codones STOP. Los exones y los intrones no están dibujados a escala (Li y Eriksson, 2003).

El exón 6 codifica una secuencia de aminoácidos básica que media la interacción con componentes de la matriz extracelular y que puede producir retención dentro de la célula. Esta secuencia básica es R¹¹¹K¹¹⁶T¹²⁵ (Lys-Arg-Thr) caracterizado en la cadena A- (Lustig et al. 1996) y en la cadena B- se ha caracterizado una secuencia básica similar R¹⁶⁰K¹⁶¹K¹⁶² en la región del *loop* III (Schilling et al. 1998). Se ha descrito que a través de esta secuencia de cargas positivas puede interaccionar de forma electrostática con los grupos cargados negativamente del heparán sulfato: el grupo N-sulfato: GlcNSO₃ del disacárido y los grupos O-sulfato en las posiciones 2-O y 6-O (Feizy et al. 1997). De esta manera, el precursor de la

cadena B- (PDGF-B_L) se vería retenido por los HS de la superficie o de la matriz extracelular hasta que el motivo de retención sea eliminado por proteasas, generando una isoforma (PDGF-B_S) mucho más difusible (Östman et al. 1991; Heldin, 1992). En el caso de la cadena A-, la presencia de ambas isoformas con y sin la secuencia básica generaría una diferente compartimentalización. La isoforma más común, la del PDGF-A corta (PDGF-A_S) puede difundir fácilmente y actuar a cierta distancia de la célula productora mientras que la isoforma PDGF-A larga (PDGF-A_L) con el motivo de retención, actúa sobre la célula productora y sobre las células más cercanas (Östman et al. 1991; Pollock y Richardson, 1992; Raines y Ross, 1992; Kelly et al. 1993).

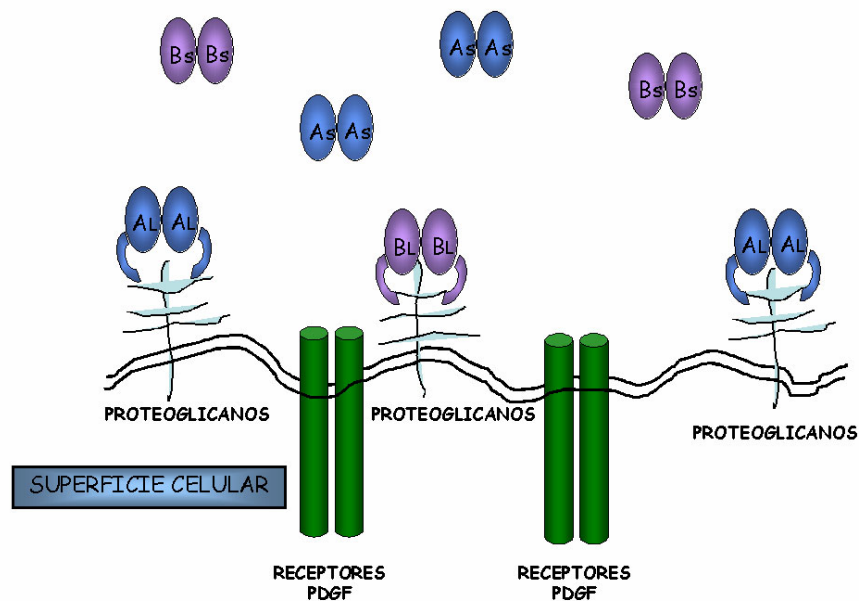


Figura 1.2. Modelo de compartimentalización de las distintas isoformas de PDGF. Las isoformas con los dominios de unión a HS (PDGF-A_L y PDGF-B_L) se verían retenidas por los proteoglicanos de la membrana o de la matriz extracelular mientras que las isoformas sin los dominios de unión a HS (PDGF-A_S y PDGF-B_S) serían fácilmente secretadas y actuarían a nivel paracrino.

Las plaquetas humanas y los cultivos de líneas celulares expresan normalmente ambos tipos de cadenas de PDGF-A y -B; dando lugar tanto a homodímeros como a heterodímeros; lo cual indica que el ensamblaje de los dimeros es un proceso al azar.

1.2 RECEPTORES DEL PDGF (I): Receptores del PDGF tirosina quinasa α - y β -

Las isoformas de PDGF ejercen sus efectos en las células a través de dos receptores con actividad tirosina quinasa: α y β (revisión Heldin y Westermark, 1999). Son receptores que están estructuralmente relacionados, ya que presentan en la región extracelular 5 dominios del tipo "immunoglobulin-like" y en la región intracelular presentan un dominio tirosina quinasa. La unión del PDGF a su receptor induce la dimerización del mismo. Así, el PDGF-A, -B y -C se unen al receptor α , y el PDGF-B y -D se unen al receptor β . De esta manera, PDGF-AA, -AB, -BB y -CC pueden inducir homodímeros $\alpha\alpha$, PDGF-AB y -BB pueden inducir heterodímeros $\alpha\beta$ y PDGF-BB y -DD inducen homodímeros $\beta\beta$. Se ha descrito también que PDGF-CC y PDGF-DD pueden activar los heterodímeros $\alpha\beta$.

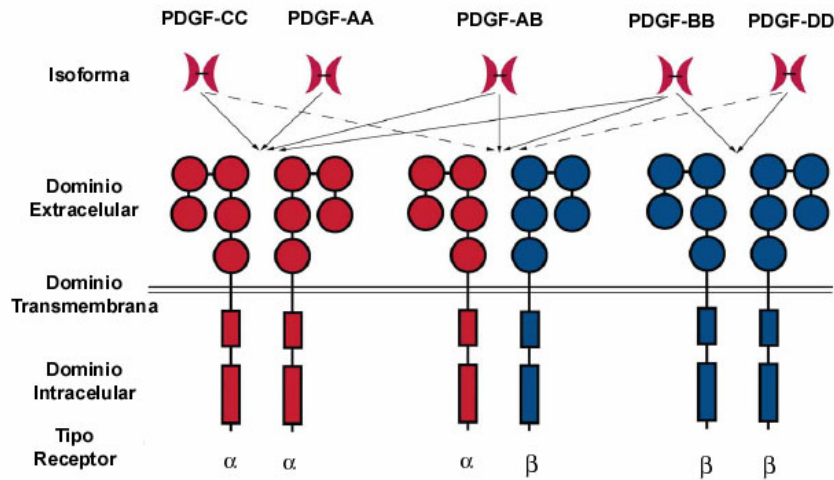


Figura 1.3. Especificidad de unión de las cinco isoformas de PDGF. Los receptores α - y β - contienen 5 dominios “immunoglobulin-like” y un dominio intracelular tirosina quinasa que puede formar homodímeros o heterodímeros. La habilidad de las isoformas de PDGF para unir y activar los dímeros de los receptores se indican con flechas continuas. Las flechas discontinuas indican la posibilidad de activar los heterodímeros (Li y Eriksson, 2003).

Los principales tipos celulares que se activan por el PDGF, es decir los fibroblastos y las células musculares lisas expresan ambos tipos de receptores α y β , aunque sobre todo expresan más receptores β . Sin embargo, hay tipos celulares que sólo expresan el receptor α , y otros líneas celulares que sólo expresan el receptor β (Tabla 1.2).

Tipo celular	α -Receptor	β -Receptor
Fibroblastos	+	+
Células mesangiales del riñón	+	+
Células Leydig	+	+
Células Itoh (hígado)		+
Células endoteliales senosoidales de hígado	+	
Mioblastos		+
Células musculares lisas	+	+
Células endoteliales de capilares		+
Pericitos		+
Astrocitos	+	
Neuronas	+	+
Células Schwann	+	+
Células epiteliales mamarias		+
Células del epitelio pigmentario (retina)	+	+
Plaquetas / megacariocitos	+	
Células T		+
Células mieloideas hematopoyéticas		+
Macrófagos		+

Tabla 1.2. Tipos celulares que expresan los receptores de PDGF (Heldin y Westermark, 1999).

El nivel de expresión de los receptores de PDGF no es constante y puede depender del estadio fenotípico de las células (Sjölund et al. 1990, Krettek et al. 1997a). Se han descrito algunos factores de crecimiento (bFGF, TGF- β) y citocinas (IL-1, IFN- γ) que están implicados en la regulación y expresión de los receptores de PDGF. Por ejemplo, durante la diferenciación de los monocitos a macrófagos el IFN- γ aumenta los niveles de receptor α (Krettek et al. 2001).

1.2.1 Mecanismos de señalización

Los diferentes complejos de receptores inducen una cascada de señalización intracelular que se traduce en diferentes efectos (revisión Heldin y Westermark, 1999; Rönstrand y Heldin, 2001). Algunos de éstos se resumen en la Tabla 1.3.

Efecto	α -Receptor	β -Receptor
Mitogénesis Reorganización actina	Estimulación Formación de "edge ruffling" y pérdida de fibras de estrés	Estimulación Formación de "edge and circular ruffles" y pérdida de fibras de estrés
Quimiotaxis	Estimulación o inhibición dependiendo del tipo celular	Estimulación
Movilización Ca ²⁺ Comunicación a través de "GAP junctions"	Estimulación débil ?	Estimulación Inhibición
Apoptosis	?	Inhibición

Tabla 1.3. Efectos celulares mediados por los homodímeros de los receptores PDGF- α y PDGF- β (Heldin y Westermark, 1999).

La dimerización permite la autofosforilación en *trans* de los residuos tirosina de los receptores. Se fosforilan los residuos tirosina conservados de los dominios quinasa lo cual aumenta la actividad catalítica quinasa y también se fosforilan otros residuos tirosina que se encuentran fuera de los dominios quinasa lo que finalmente permite que se acoplen moléculas de señalización intracelular con dominios SH₂. Las proteínas con dominios SH₂ que se unen a los receptores de PDGF se resumen en la Tabla 1.4.

En particular, la PI3-quinasa es importante para la migración celular, reorganización de la actina, mitogénesis y antiapoptosis. La activación de Ras (que activa la cascada MAPK) y la de la tirosina quinasa Src (que induce el factor de transcripción Myc) son importantes para la señal mitogénica del PDGF. La activación de los receptores de PDGF genera cascadas de señalización que se modulan de forma positiva o negativa entre sí, formando una red intracelular de vías de señalización (Figura 1.4).

Molécula Transdutora Señal	Dominio de unión	Unión al Receptor-α	Unión al Receptor-β	Efectos señalización
PI-3 quinasa	Subunidad catalítica con actividad PI-3 quinasa y subunidad reguladora con 2 dominios SH ₂ y 1 SH ₃	Tyr-731 Tyr-742	Tyr-740 Tyr-751	Activa las serina/ treonina quinasas p70 y S6, Akt/PKB, JNK/SAPK y ciertos miembros de la familia PKC; activa miembros de la familia Rho
PLC- γ	Fosfolipasa con 2 SH ₂ , 1 SH ₃ y 2 dominios PH	Tyr-988 Tyr-1018	Tyr-1021 (Tyr 1009)	Aumento de Ca ²⁺ y diacilglicerol, que activa miembros de la familia PKC
Src	Tirosina quinasa con 1 SH ₂ y 1 SH ₃	Tyr 572 (Tyr-574)	Tyr-579 (Tyr-581)	
SHP-2	Tirosina fosfatasa con 2 dominios SH ₂	Tyr-720 Tyr-754	Tyr-1009 (Tyr-763)	Defosforila los receptores autofosforilados, une Grb2/Sos
GAP	GAP con 2 SH ₂ , 1 SH ₃ y 1 dominio PH	No se une	Tyr-771	Inactiva Ras
Stat5	Factor de transcripción con 1 SH ₂ y 1 SH ₃	Unión débil	Tyr-579 Tyr-581 Tyr-775	Se une a las regiones promotoras de genes específicos
Shc	Molécula adaptadora con 1 SH ₂ y 1 PTP	?	Tyr-579 Tyr-740 Tyr-751	Se une a Grb2/Sos
Grb2	Molécula adaptadora con 1 SH ₂ y 2 SH ₃	?	Tyr-716 Tyr-775	Forma complejo con Sos que activa Ras
Grb7	Molécula adaptadora con 1 SH ₂ y 3 SH ₃	?	Tyr-716 Tyr-775	
Nck	Molécula adaptadora con 1 SH ₂ y 3 SH ₃	?	Tyr-751	Activa las serina/ treonina quinasas PAK y NIK
Crk	Molécula adaptadora con 1 SH ₂ y 1 o 2 SH ₃	Tyr-702	No se une	Activa el factor de intercambio de nucleótidos C3G

Tabla 1.4. Moléculas de transducción de señal con dominios SH₂ que interactúan con los receptores de PDGF (Heldin y Westermark, 1999).

1.2.2 Vías de señalización implicadas en la mitogénesis y quimiotaxis inducida por el PDGF

Los receptores $\alpha\alpha$ y los receptores $\beta\beta$ del PDGF producen activación de la mitogénesis aunque hay diferencias respecto a la quimiotaxis. El receptor β del PDGF tanto en su forma homodimérica como en la forma heterodimérica asociado con el receptor α estimula la quimiotaxis. El receptor α media la quimiotaxis según el tipo celular. El receptor heterodimérico $\alpha\beta$ presenta diferentes propiedades respecto a los homodímeros. Así, se ha descrito que presenta una actividad mitogénica y quimiotáctica mucho más grande que la de los homodímeros en las células que expresan ambos receptores (Heidaran et al. 1991; Rupp et al. 1994). En células musculares lisas se ha descrito que el receptor PDGF α antagoniza la quimiotaxis inducida a través del receptor PDGF β (Koyama et al. 1994). Las vías de señalización implicadas en la mitogénesis y en la quimiotaxis son similares. En la tabla 1.5 se resumen las principales proteínas que intervienen en ambas vías:

Molécula	Tipo de molécula	Receptor- α	Receptor- β	Señalización
Src, Yes, Fyn	Tirosina quinasa citoplasmática	Tyr-572, Tyr-574	Tyr-579 Tyr 581	Mitogénesis
PI-3 quinasa	Quinasa de lípidos	Tyr-731 Tyr-742	Tyr-740 Tyr-751	Mitogénesis, quimiotaxis
RasGAP	Proteína GTPasa inactivadora de Ras	No se une	Tyr-771	Mitogénesis, quimiotaxis
SHP-2	Tirosina fosfatasa	Tyr-720 Tyr-754	Tyr-763 Tyr-1009	Mitogénesis, quimiotaxis
PLC- γ 1	Lipasa	Tyr-998 Tyr-1018	Tyr-1009 Tyr-1021	Mitogénesis, quimiotaxis
Grb2	Molécula adaptadora	No se une	Tyr-716	Mitogénesis, quimiotaxis
Nck	Molécula adaptadora	No se une	Tyr-751	?
Grb10	Molécula adaptadora	?	Tyr-771	Mitogénesis, quimiotaxis?
Shc	Molécula adaptadora	No se une	Tyr-579, Tyr-740 Tyr-751	Mitogénesis, quimiotaxis
Grb7	Molécula adaptadora	No se une	Tyr-775	?
Crk	Molécula adaptadora	Tyr-762	No se une	?
Stat5	Factor de transcripción	?	Tyr-579, Tyr-581 Tyr-775	?

Tabla 1.5. Moléculas de transducción de señal que se unen a los receptores de PDGF y que generan diversas cascadas de señalización (Rönstrand y Heldin, 2001).

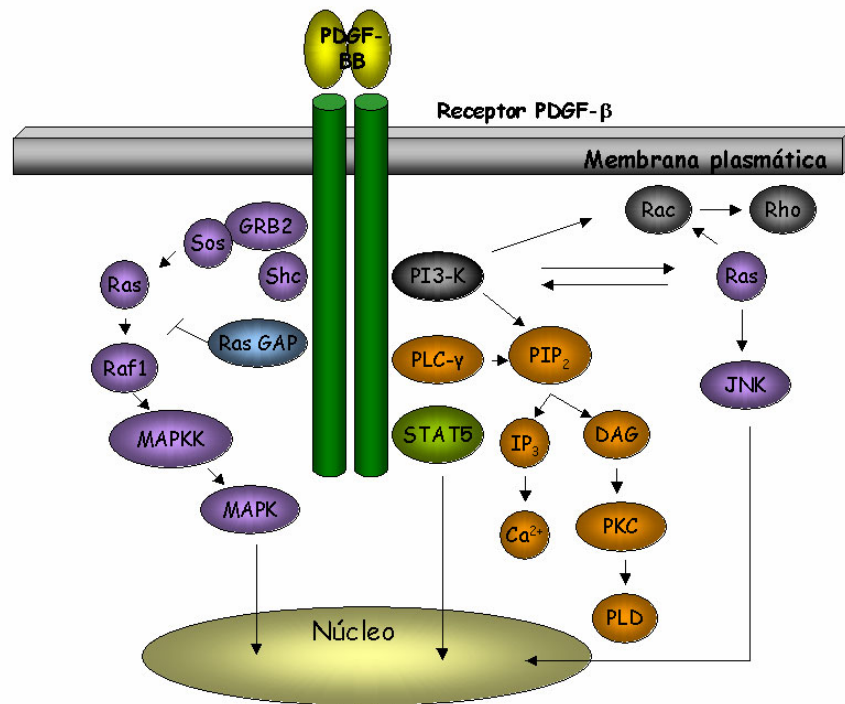


Figura 1.4. Esquema simplificado de las principales vías de señalización mediadas por el PDGF.

1.2.3 Función del PDGF *in vivo*

El PDGF tiene un papel importante en la embriogénesis, en particular en el desarrollo del riñón, vasos sanguíneos, pulmones y sistema nervioso central. En estos órganos, el PDGF es importante para las células derivadas del tejido conectivo, entre ellas los pericitos, los fibroblastos alveolares, las células mesangiales del riñón y las células glía. También el PDGF tiene un papel importante en la curación de heridas en el adulto, ya que estimula la mitogénesis y quimiotaxis de los fibroblastos y células musculares lisas. También estimula la quimiotaxis de los neutrófilos y los macrófagos (revisión Heldin y Westermark, 1999).

1.2.4 PDGF en la enfermedad

La actividad incrementada del PDGF se ha relacionado con diferentes enfermedades (Östman y Heldin, 2001; Heldin y Westermark, 1999). Se ha observado una estimulación autocrina del crecimiento celular tumoral en la progresión del glioblastoma y de sarcomas (Yu et al. 2003). También se ha observado una estimulación paracrina del PDGF producido por las células tumorales sobre las células del estroma.

También se ha implicado el PDGF en la aterosclerosis (ver sección 1.4) y en fibrosis de pulmón, de riñón, en la artritis reumatoide, cirrosis del hígado y en la mielofibrosis.

1.3 RECEPTORES DEL PDGF (II): Proteoglicanos

Los proteoglicanos (PGs) son macromoléculas compuestas por cadenas de carbohidratos o glúcidos unidas de forma covalente a una proteína núcleo (revisión Kjellén y Lindahl, 1991; Wight et al. 1991). El componente glucídico lo conforman los glicosaminoglicanos (GAGs) que son unidades de disacáridos que se repiten n veces (siendo n desde 1 a < 100) de: un residuo de hexosamina [ya sea D-glucosamina (**GlcN**) o D-galactosamina (**GalN**)] unidas con un ácido hexurónico [ácido D-glucorónico (**GlcA**) o ácido L-idurónico (**IdoA**)] o con una unidad de galactosa (**Gal**). Los GAGs presentan además grupos sulfato en diferentes posiciones.

Según la hexosamina sea **GlcN** o **GalN** tenemos:

- Galactosaminoglicanos: condroitín sulfatos (CS) y dermatán sulfatos (DS)
- Glucosaminoglicanos: heparán sulfatos (HS), heparina y keratán sulfatos (KS).

Dependiendo del segundo constituyente del disacárido, podemos diferenciar:

- DS, HS y heparina contienen indistintamente **GlcA** o **IdoA**.
- CS sólo contiene **GlcA**.
- KS contiene **Gal**.

Así tenemos:

CS:	(GlcA-GalN)
DS:	(GlcA-GalN) o (IdoA-GalN)
HS, heparina:	(GlcA-GlcN) o (IdoA-GlcN).
KS:	(Gal-GlcN)

Con excepción del ácido hialurónico, que es el único GAG que se presenta como polisacárido libre sin unión a proteína, todos los GAGs se sintetizan como proteoglicanos, es decir, con unión covalente a una proteína. Los CS, DS, HS y heparina se unen a la proteína a través de un puente Gal-Gal-Xyl-O-serina de la proteína núcleo. La unión de los KS a la proteína núcleo puede ser de tipo O-serina o O-threonina (cartílago) o de tipo N-asparagina (córnea). La proteína núcleo, además del dominio de unión a GAG, puede presentar otros dominios hidrofóbicos que permitan el anclaje del PG a la membrana plasmática u otros dominios específicos de interacción con macromoléculas de la matriz extracelular. Algunas proteínas núcleo se unen a la membrana plasmática a través de un grupo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) como en el caso de los glicoproteínas (HSPGs). Aparte de una función estrictamente mecánica, los dominios intracelulares pueden participar mediando respuestas celulares tales como la reorganización del citoesqueleto de actina o interactuando con proteínas de señalización intracelular.

1.3.1 Heparán sulfatos

Existe una extraordinaria variabilidad debido a que también el componente **GlcN** del disacárido puede estar N-acetilado: **GlcNAc (N-acetilglucosamina)** o N-sulfatado: **GlcNSO₃**. También se pueden generar derivados con O-sulfataciones: **Ido-A (2-O-SO₃)**; **GlcN (6-O-SO₃; 3-O-SO₃)**; **GlcA (2-O-SO₃; 3-O-SO₃)**.

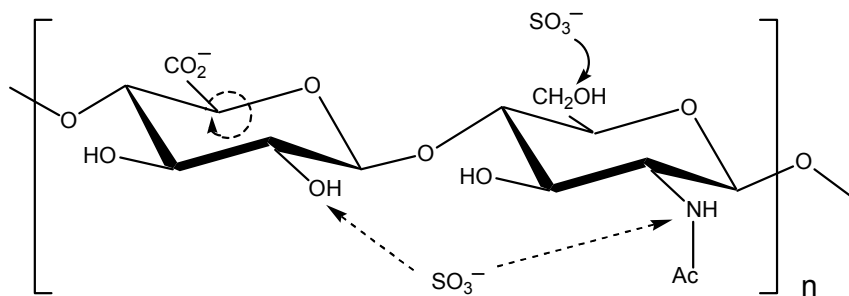


Figura 1.5. Estructura química de los heparán sulfatos / heparina (Wight et al. 1991)

En general, la heparina contiene más N- y O- sulfataciones y más residuos **IdoA** que los heparán sulfatos que por su parte contienen más residuos **GlcNAc** y **GlcA** (Lindahl y Kjellén, 1991; Salmivirta et al. 1996). Sin embargo, no hay una distinción clara en términos cuantitativos de residuos glucídicos característicos de la heparina o de los HS. Por ello, se considera que la heparina es el GAG que proviene de PGs sintetizados por los mastocitos con propiedades anticoagulantes. Todos los demás GAGs estructuralmente relacionados con la heparina son los heparán sulfatos.

La heparina es un PG comúnmente utilizado para los estudios de interacción y competición de la unión de algunas proteínas con los GAGs (Lindahl, 1999). Sin embargo, estos estudios no implican necesariamente una función biológica ya que la heparina se encuentra normalmente en el interior de los mastocitos y es una macromolécula que presenta un elevado número de cargas negativas. Además, debido a la presencia de los residuos **IdoA**, presenta cierta flexibilidad en las cadenas glucídicas en comparación con los condroitín sulfatos que también presentan una densidad de carga negativa similar.

1.3.2 Condroitín sulfatos y dermatán sulfatos

Los residuos **GalN** son acetilados dando lugar a **GalNAc (N-acetilgalactosamina)**. Estos residuos **GalNAc** se unen indistintamente a **GlcA** (CS o DS) o a **IdoA** (DS) y también se pueden O-sulfatar en diferentes posiciones. La distinción entre CS y DS tampoco es evidente según las proporciones de **IdoA**. En realidad, ambos se diferencian según la degradación diferencial con 2 enzimas liasas procedentes de bacterias: la condroitinasa ABC elimina los residuos CS y DS y la condroitinasa AC corta específicamente los residuos CS.

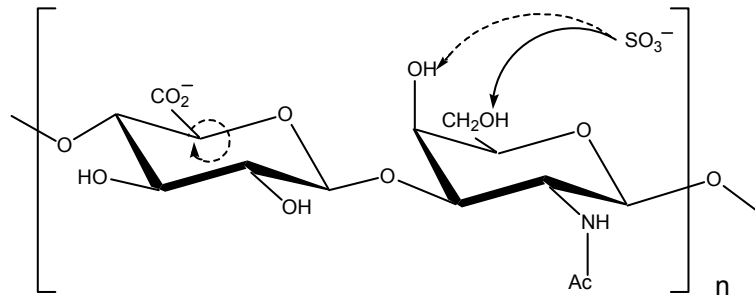


Figura 1.6. Estructura química de los condroitín sulfatos / dermatán sulfatos (Wight et al. 1991).

1.3.3 Keratán sulfatos

La **GlcN** es acetilada: **GlcNAc (N-acetilglucosamina)** formando el par: **Gal-GlcNAc** que puede ser sulfatado en cualquiera de los dos componentes del disacárido.

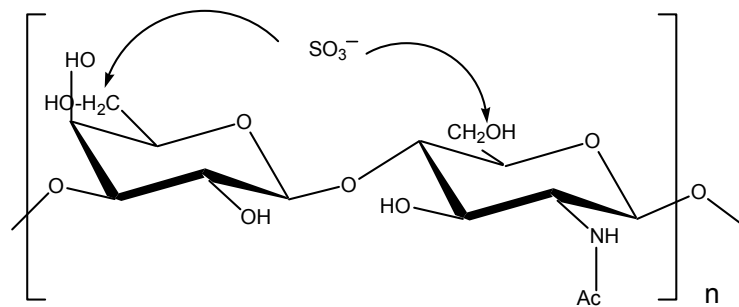


Figura 1.7. Estructura química de los keratán sulfatos (Wight et al. 1991).

1.3.4 Clasificación de los Proteoglicanos

Los PGs según su localización se pueden clasificar en:

- PGs intracelulares (en gránulos de secreción).
- PGs de la superficie celular.
- PGs de la matriz extracelular.

De esta manera, los PGs se pueden agrupar en diferentes familias, según su función, localización o características estructurales más comunes (ver Tabla 1.6).

Nombre	Fuente	Tamaño proteína núcleo (kDa)	Cadenas GAG	Función propuesta, características
EXTRACELULARES				
Familia a: Proteoglicanos intersticiales grandes o hialectanos				
Agrecano	Cartílago	220	>100 CS/KS	Soporte mecánico, une ácido hialurónico y lectinas
Versicano	Fibroblastos	265	10-30 CS/DS	Une ácido hialurónico y lectinas, migración celular
Familia b: Proteoglicanos intesticiales pequeños (<i>leucine-rich</i>)				
Decorina	Tejido conectivo	40	1 DS/CS	Fibrilogénesis del colágeno, adhesión celular, unión a TGF- β
Biglicano	Tejido conectivo	40	2 DS/CS	Adhesión celular
Fibromodulina	Tejido conectivo	42	2-3 KS	Fibrilogénesis colágeno, adhesión celular
Lumicano	Córnea	38	3-4 KS	Fibrilogénesis colágeno
Familia c: Proteoglicanos de membrana basal				
Perlecano	Membrana basal	467	3 HS/CS	Mantenimiento del epitelio y tejidos mesenquimales
Agrina	Unión neuromuscular	250	3 HS	Agrega receptores de acetilcolina
Bamacano	Membrana basal	138	3 CS	Estabilización de membranas basales
SUPERFICIE CELULAR				
Familia d: Proteoglicanos de la superficie celular				
Sindecano-1	Epitelio	31	1-3 CS/1-2 HS	Morfogénesis, adhesión celular
Glipicano (unión a la membrana mediante GPI)	Endotelio	62	3-4 HS	Unión a VEGF, anti-trombina III
Betaglicano ("part-time" PG)	Fibroblastos	110	1-4 CS, HS	Unión a TGF- β
NG2	Células nerviosas	251	2-3 CS	Adhesión celular
Trombomodulina ("part-time" PG)	Endotelio	60	1 CS	Regula coagulación
CD44 ("part-time" PG)	Linfocitos/fibroblastos	32-49	0-5 CS/HS	Une ácido hialurónico
INTRACELULARES				
Familia e: Proteoglicanos intracelulares				
Serglicina	Plaquetas, macrófagos, eosinófilos, basófilos,...	10-19	10-15 CS/DS, HS/Heparina	Modula proteasas gránulos, inhibe coagulación (heparina)

Tabla 1.6. Algunos de los proteoglicanos mejor caracterizados agrupados según la clasificación de Kjellén y Lindhal, 1991. (Kjellén y Lindahl, 1991; Iozzo, 1998).

1.3.5 Funciones de los Proteoglicanos

Las funciones de los PGs son tan diversas que van desde la organización de la matriz extracelular, median la adhesión celular y la migración, regulan la proliferación y diferenciación (Kjellén y Lindahl, 1991; Hardingham y Fosang, 1992; Wight et al. 1992; Bernfield et al. 1999; Tumova et al. 2000). En ellas intervienen los GAGs, la proteína núcleo o la acción conjunta de ambos componentes. Las proteínas núcleo de los PGs aparte de servir de anclaje y localización de las cadenas de GAGs, tienen la función de determinar si los PGs se localizan en la superficie celular, en gránulos intracelulares (en mastocitos) o en la matriz extracelular.

1.3.5.1 Función de las proteínas núcleo de los PGs

Las proteínas núcleo de los PGs también intervienen en procesos más complejos tales como la reorganización del citoesqueleto de actina y formación de contactos focales, procesos en los que también intervienen las integrinas. La proteína núcleo de los sindecanos (HSPG) puede formar dímeros y oligómeros (uniones no-covalentes) entre varias moléculas de sindecanos (Carey, 1997). Las proteínas núcleo de los PGs intervienen en la captura e internalización de proteínas tales como la lipoproteína lipasa y la trombospondina entre otras funciones. Las proteínas núcleo también pueden intervenir en la unión a diferentes ligandos (Herndon et al. 1999). Se ha descrito que la proteína núcleo del betaglicano (PG de la superficie celular) y de la decorina (DSPG) puede unir factores de crecimiento de la familia de TGF- β (Hildebrand et al. 1994). La proteína núcleo del perlecano (HSPG) puede unir al PDGF-AA y PDGF-BB (Göhring et al. 1998) y la proteína núcleo del NG2 (CSPG) puede unir al bFGF y PDGF-AA (Goretzki et al. 1999).

1.3.5.2 Organización de la matriz extracelular

Los PGs mantienen la integridad estructural de los tejidos conectivos y les confieren sus propiedades físicas (revisado en Iozzo, 1998). Un ejemplo es el de la matriz extracelular del cartílago, que está constituida por el agregano que se asocia estrechamente con el ácido hialurónico y otras proteínas (Knudson y Knudson, 2001). Otro ejemplo es el de la decorina, la fibromodulina y el lumicano, que controlan la formación de las fibras de colágeno (fibrilogénesis).

En la matriz extracelular, los PGs actúan como reservorios de factores de crecimiento y citocinas que pueden ser liberados de forma activa para interactuar con los receptores de alta afinidad (Vlodavsky et al. 1996).

1.3.5.3 Interacciones a nivel de la superficie celular

Dos grandes familias de HSPGs de superficie celular, la familia de los sindecanos y de los glicicanos unen una variedad de factores de crecimiento, moléculas de la matriz extracelular, receptores de adhesión celular, enzimas, etc; y están implicadas en multitud de procesos que tienen lugar en la superficie de las células (revisado en Bernfield et al. 1999, Tumova et al. 2000). La familia de los sindecanos son proteínas transmembrana con un dominio citoplasmático intracelular y se han descrito en mamíferos 4 miembros que se pueden subdividir en dos familias: el sindecano-1 y el sindecano-3 por un lado y el sindecano-2 y sindecano-4 por otro lado según las homologías de secuencia. Los glicicanos se unen a la membrana a través de una molécula glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Existen 6 tipos de glicicanos y la mayoría se expresan en tejidos neuronales excepto el glicicano-2 que se localiza en la membrana basolateral.

Las interacciones a nivel de la superficie celular de tipo: célula- matriz extracelular, célula-célula; célula-patógeno microbiano, co-receptor de factores de crecimiento, citocinas y otros ligandos solubles permiten la activación de distintos procesos celulares: adhesión celular, movilidad, proliferación celular, diferenciación celular y morfogénesis (revisado en Bernfield et al. 1999).

1.3.5.3.1 *Adhesión célula-célula*

- Estabilización de las uniones intercelulares: Los HSPGs se unen a las moléculas de adhesión célula-célula (moléculas de adhesión de la superfamilia de las Ig, selectinas, integrinas, etc.) en sitios secundarios (en el caso de las moléculas de adhesión de la superfamilia de las Ig) o como receptor para las selectinas, integrinas y otras moléculas de adhesión célula-célula, con la función de incrementar la fuerza y la estabilidad de las adhesiones célula-célula y proporcionar unión al citoesqueleto (revisado en Carey, 1997; Bernfield et al. 1999).
- Mantenimiento del fenotipo diferenciado: El sindecano-1 mantiene el fenotipo epitelial a través de la organización del esqueleto de actina y modulando la expresión de la E-cadherina (Kato et al. 1995).

1.3.5.3.2 *Adhesión célula-matriz extracelular*

La matriz extracelular está formada por una variedad de proteínas estructurales con diferentes dominios a través de los cuales se unen a las integrinas (proteínas transmembrana que conectan el citoesqueleto de la célula con proteínas de la matriz extracelular o con otros receptores de las células vecinas), a receptores heterodiméricos de proteínas de la matriz extracelular y a HSPGs. En general, los HSPGs actúan como receptores y co-receptores de estas interacciones, modifican la organización del citoesqueleto y son responsables de la adhesión y migración celular.

- Receptores de proteínas estructurales de la matriz extracelular: Los HSPGs pueden actuar como receptores de proteínas de la matriz extracelular durante el desarrollo y también pueden unir proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno, fibronectina, trombospondina, vitronectina y laminina (Jackson et al. 1991).
- Formación de adhesiones focales: La unión del sindecano-4 al dominio de unión de heparina de la fibronectina es necesario para la formación de las fibras de stress y la maduración de las adhesiones focales en las células mesenquimales, proceso en el que también intervienen las integrinas (Woods y Couchman, 1998).
- Adhesión y migración celular: La adhesión y la migración celular requiere la acción conjunta de los GAGs como moléculas secuestradoras de ligando, que en este caso se trataría de una proteína de la matriz extracelular y de la interacción directa o indirecta de la proteína núcleo con proteínas del citoesqueleto y moléculas de señalización (Martin, 1998; Rapraeger y Ott, 1998).

1.3.5.3.3 *Patogénesis e invasión microbiana*

Numerosas bacterias, protozoos y virus presentan unas proteínas llamadas adhesinas que unen HSPGs a través de las cuales se unen a la superficie de la célula diana y desencadenan la patogénesis (revisado en Rostand y Esko, 1997). Los HSPGs también actúan como co-receptores de otras proteínas que median la invasión. Se ha descrito que la invasión de algunos patógenos generan cascadas de señalización que incrementan el “*shedding*” de los sindecanos (ver 1.3.5.3.4).

1.3.5.3.4 *Co-receptores de factores de crecimiento y citocinas*

Los HSPGs de superficie localizan y concentran ligandos solubles (factores de crecimiento, citocinas) en regiones específicas de la membrana (por ejemplo en contactos focales), secuestran el ligando cerca de otros receptores que se encuentran en las mismas estructuras y modulan su actividad (los sindecanos estabilizan las interacciones entre el receptor y el ligando, lo cual aumenta la activación de los receptores a bajas concentraciones del ligando). Como co-receptores, los HSPGs modulan la unión del ligando con su receptor, participando en la activación o inhibición de las vías de señalización de proliferación celular, migración y diferenciación (Carey, 1997; ver Tabla 1.7).

Proteínas de unión a heparina	Efecto	Bibliografía
Factores de crecimiento y citocinas		
FGF-2 (bFGF)	Dimerización, protección de la degradación, estimulación de la interacción con el receptor tirosina-quinasa, internalización	Guimond et al. 1993 Sasisekharan et al. 1997 Gallagher, 1998
FGF-1 (aFGF)		Guimond et al. 1993
HGF	Retención del HGF	Ashikari et al. 1995
IFN- γ	Dimerización y modulación del procesamiento proteolítico	Lortat-Jacob et al. 1995
IL-8	Protección de la degradación, secuestran la IL-8 e impiden su difusión	Spillmann et al. 1998
PDGF-AA	Reserva y secreción de PDGF-AA, puede afectar la unión a su receptor	Feyzi et al. 1997
Factor de plaquetas-4	Estimula la actividad del factor de plaquetas-4	Stringer y Gallagher, 1997
Enzimas		
Lipoproteína lipasa	Estabilización de la LPL dimérica, inmovilización, internalización, transporte	Parthasarathy et al. 1994
Inhibidores con actividad proteasa		
anti-trombina III	Cambio conformacional del inhibidor, aumentando su actividad	Lindahl et al. 1984

Tabla 1.7. Algunas de las proteínas de unión a heparina (Tumova et al. 2000)

En un principio, se pensaba que la interacción con el ligando (o proteína de unión a heparina) era una interacción de tipo iónico que tenía lugar entre los HS cargados negativamente y las cargas positivas de las proteínas. Sin embargo, existen secuencias de longitud y estructura definidas de GAGs que permiten la unión específica al ligando. También intervienen fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Thompson et al. 1994). La presencia de residuos **IdoA** favorecen la unión de los GAGs a las proteínas (Casu et al. 1988). Las proteínas por su parte presentan residuos básicos (Lys, Arg y Gln) a través de los cuales interactúan con los HS (revisión Hileman et al. 1998). También es importante la disposición de estas secuencias básicas en la estructura secundaria de las proteínas.

Los sindecanos pueden ser proteolíticamente escindidos de la superficie en un proceso conocido como “*shedding*” (Bernfield et al. 1999) con lo cual se libera el dominio extracelular que pueden actuar como moléculas solubles (agonistas o antagonistas) que regulan la actividad de sus ligandos. El “*shedding*” de los sindecanos es un proceso natural que ocurre como parte del “*turnover*” de los HSPG, pero también puede ser acelerado debido a la activación de proteasas extracelulares (metaloproteinasas) o la activación de determinadas vías de señalización.

1.3.5.3.5 Receptores de ligandos solubles

Los HSPGs pueden actuar como receptores de ligandos solubles (factores de crecimiento, enzimas, inhibidores con actividad proteasa, etc.) regulando su internalización y procesamiento en regiones específicas de la membrana (en caveolas o en “*clathrin-coated pits*”). Se han propuesto tres modelos del procesamiento de los ligandos unidos a HSPG (Williams y Fuki, 1997):

- Endocitosis mediada directamente por los HSPGs.
- Unión del ligando a los HSPGs y reclutamiento de otras moléculas (por ejemplo, la unión de la LDL (lipoproteínas de baja densidad) con HSPGs permite la interacción con la familia de los receptores de la LDL que median la internalización del ligando).
- Unión del ligando a los HSPGs seguido de un cambio de conformación del ligando que permite la interacción con su receptor de alta afinidad o la unión a HSPGs aumenta la afinidad del ligando por su receptor de alta afinidad (por ejemplo la unión dependiente de HSPG del FGF-2 al receptor de FGF).

Uno de los ligandos de HS más estudiados es el FGF-2. El FGF-2 se une al receptor de FGF con alta afinidad ($K_d = 20-200$ pM) mientras que la afinidad a los HSPGs es mucho menor (1-100 nM). Los HSPGs actúan de co-receptores del FGF a través de la unión del FGF a secuencias específicas de GAGs (pentasacáridos con **Ido-A (2-O-SO₃)**; aunque también son necesarios para iniciar la señalización deca-sacáridos con **Ido-A (2-O-SO₃)** y **GlcN (6-O-SO₃)**). Los HSPGs intervienen en la dimerización del FGF y en consecuencia participan en la dimerización de los receptores de FGF, activando la transducción de señal del FGF (revisado en Sasisekharan et al. 1997). Se ha descrito que los HSPGs pueden intervenir en la internalización del FGF, de manera independiente o con el receptor del FGF (Roghani y Moscatelli, 1992; Sperinde y Nugent, 1998).

Los ligandos pueden ser internalizados junto con los HSPGs como parte del “*turnover*” de los HSPGs y ser reciclados. La degradación de las cadenas de HS tiene lugar en los lisosomas (Yanagishita, 1998).

1.3.5.3.6 *Metabolismo de lipoproteínas*

La unión de la LPL (lipoproteína lipasa) es clave en el metabolismo de las lipoproteínas. La LPL dimérica se une con alta afinidad a los HS de la superficie de las células endoteliales y de los hepatocitos donde hidroliza los triglicéridos de los quilomicrones y de las VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad). También se une a las apolipoproteínas B y E de las lipoproteínas lo que permite su internalización y degradación (Williams y Fuki, 1997). La LPL y la apolipoproteína E permiten la unión de la LDL y VLDL al receptor de LDL y a LRP (proteína relacionada con el receptor de LDL) favoreciendo la internalización de las lipoproteínas a través de estos receptores (Chappell et al. 1993, Mulder et al. 1993, Ji et al. 1994). Los sindecanos pueden también mediar directamente la internalización de la LPL y de las lipoproteínas unidas a la LPL en regiones específicas de la membrana a través de una vía cuantitativamente más importante que la vía del LRP (Sehayek et al. 1996).

La unión directa de las lipoproteínas a los GAGs de la matriz extracelular de las arterias es un proceso que tiene vital importancia en el desarrollo de la aterosclerosis. Se ha observado que las diferentes especies de GAGs (HS, CS, DS) presentan distinta afinidad por las lipoproteínas (Olsson et al. 2001). Los HSPG de superficie celular (sindecanos; Williams y Fuki, 1997) y de la matriz extracelular (perlecano; Fuki et al. 2000) participan además directamente en el catabolismo de las lipoproteínas; aunque siguiendo diferentes vías de internalización. También es de destacar el papel de los CSPGs y DSPGs de la matriz extracelular en la retención de las lipoproteínas, proceso desencadenante de la aterosclerosis (revisado en Williams, 2001).

1.3.5.4 Actividad anticoagulante

Los HSPGs y la heparina pueden impedir la coagulación sanguínea a través de la unión con la anti-trombina III (Bourin y Lindahl, 1993; Conrad, 1998). La anti-trombina III es una proteasa que inhibe la actividad proteolítica de la trombina que a su vez genera fibrina a partir del fibrinógeno y desencadena la coagulación. La unión de los HSPGs a la anti-trombina III aumenta la actividad inhibitoria de la anti-trombina III hacia la trombina. Otras proteasas de la cascada de coagulación que están reguladas por interacción con HSPGs son el cofactor de heparina II, el inhibidor de la proteína C y la nexina-1 (Bourin y Lindahl, 1993).

1.4 La aterosclerosis

La aterosclerosis es el resultado de una respuesta inflamatoria de la pared de los vasos sanguíneos a diferentes formas de lesión. En el estadio crónico de la enfermedad se forman lesiones focales o placas o se forman trombos que acaban ocluyendo la luz de los vasos (revisión Lusis, 2000; Glass y Witztum, 2001; Martínez-González et al. 2001).

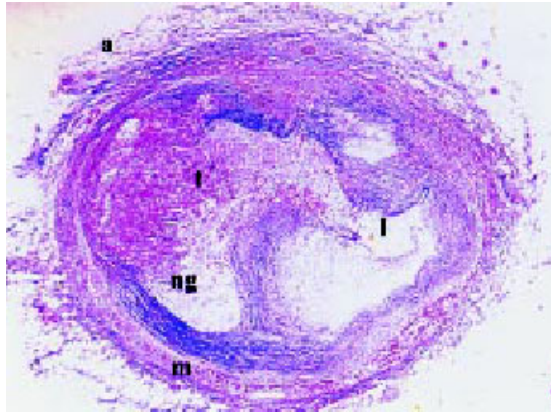


Figura 1.8. Micrografía de una tinción con tricrómico de Masson de una sección correspondiente a una arteria coronaria humana que presenta una lesión avanzada. Se pueden apreciar el núcleo lipídico y la gran cantidad de matriz extracelular que constituye el componente mayoritario de la placa que contribuye a obstruir la luz del vaso. a: adventicia; l: lumen; m: media; ng: núcleo grasoso; t: trombo (Martínez-González et al. 2001).

La lesión se origina a partir de la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial. Las LDL retenidas son oxidadas generando en primer lugar las LDLmm (LDL mínimamente modificadas) y después las LDLox (LDL oxidadas) que producen moléculas con actividad quimiotáctica para monocitos y células musculares lisas. Los monocitos pasan a través del endotelio, se diferencian en macrófagos y captan las LDLox a través de los receptores "scavenger" transformándose en células espumosas (*foam cells*) que al acumularse en la íntima originan la estría grasa (Figura 1.9A). Las células endoteliales, células musculares lisas, macrófagos y linfocitos T generan diferentes factores de crecimiento, citocinas y otras sustancias que regulan la respuesta inflamatoria y la proliferación celular. La respuesta inflamatoria genera la formación de una neoíntima en la que se acumulan monocitos y linfocitos seguida de la migración y proliferación de las células musculares lisas. Las células musculares lisas proliferan, captan las LDLox y producen proteínas de la matriz extracelular que darán origen al desarrollo de una cubierta fibrosa o "*fibrous cap*" (Figura 1.9B).

Se produce una respuesta fibroproliferativa que hace que la estría grasa evolucione a una placa aterosclerótica más compleja. Estas placas pueden ser más o menos estables, dependiendo de su cubierta fibrosa que está formada fundamentalmente por proteínas de la matriz extracelular tales como las fibras de colágeno y los proteoglicanos que son sintetizados por las células musculares lisas. Las placas que son más inestables presentan un gran núcleo lipídico rodeado por una cubierta fibrosa delgada. El núcleo lipídico se compone de células espumosas y de células musculares lisas que han internalizado las LDLox y también de material lipídico extracelular que proviene de la retención de las lipoproteínas circulantes y de los lípidos liberados por las células que sufren necrosis. Las placas más complejas pueden presentar calcificación, ulceración en la superficie luminal y hemorragia de los pequeños vasos que crecen en la lesión procedentes de la capa media del vaso sanguíneo. Finalmente la rotura o ulceración de las placas inestables genera la exposición de superficies procoagulantes y protrombóticas que provocan la activación de las plaquetas y la formación de trombos (Figura 1.9C).

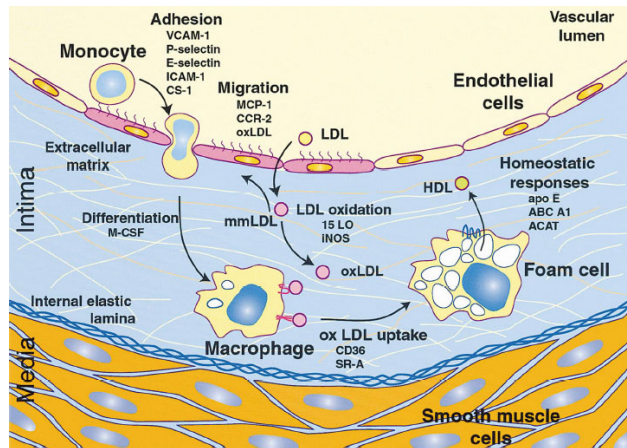


Figura 1.9 A. Inicio de la lesión aterosclerótica (Glass y Witztum, 2001)

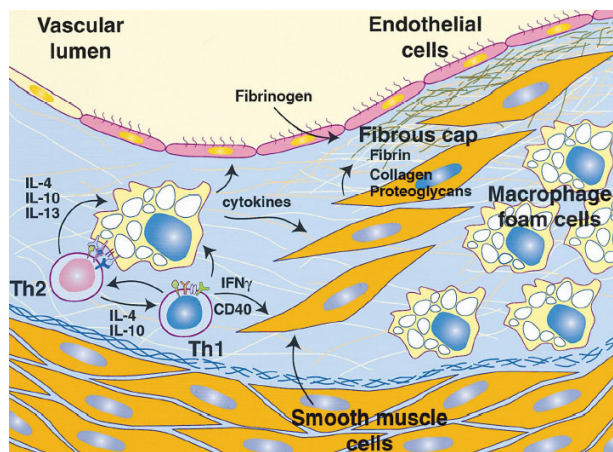


Figura 1.9 B. Progresión de la lesión (Glass y Witztum, 2001)

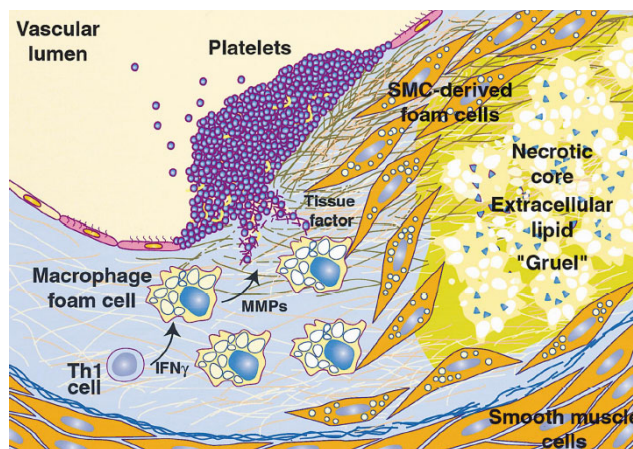


Figura 1.9 C. Ruptura de la placa y trombosis (Glass y Witztum, 2001)

1.4.1 La restenosis

La restenosis es la disminución del lumen del vaso sanguíneo que tiene lugar tras la angioplastia que se practica con el fin de permitir el riego sanguíneo en el vaso (Dangas y Kuepper, 2002). La angioplastia es la inserción de un catéter en la ingle o en el brazo de un paciente con lesión aterosclerótica y que es guiado a través de la aorta a las arterias coronarias hasta el lugar de la lesión. Una vez aquí, las arterias se abren con un globo que se encuentra en el extremo del catéter. Hoy en día, se utilizan muelles metálicos (*stents*) en lugar del globo para abrir las arterias. La mayoría de las restenosis se desarrollan entre los 3-4 meses después de la intervención hasta los 6 meses en que el lumen del vaso vuelve a cerrarse otra vez (Dangas y Fuster, 1996). La restenosis se desarrolla en 3 fases:

- I. Retracción elástica del vaso a las 24 horas de la intervención como consecuencia de la dilatación del globo.
- II. Formación y organización del trombo durante 2 semanas. Debido a la pérdida del endotelio, las plaquetas se agregan y liberan el contenido de sus gránulos: (trombina, PDGF, tromboxano A₂, serotonina, factor de Von Willebrand, fibronectina, fibrinógeno) de los cuales el PDGF es el factor de crecimiento más importante que promueve la proliferación y migración de las células musculares lisas.
- III. Proliferación de la neointima y síntesis de matriz extracelular en 3 meses. Las células musculares lisas migran desde la media a la íntima donde proliferan y sintetizan matriz extracelular que está compuesta de biglicano (DSPG), ácido hialurónico y colágeno de tipo I y III (Riessen et al. 1994).

Las lesiones restenóticas son diferentes respecto a las lesiones ateroscleróticas primarias puesto que presentan mayor cantidad de células musculares lisas, ausencia de decorina, el colágeno forma capas de densidad variable y por la presencia de tejido degradado (Garratt et al. 1991; Riessen et al. 1994).

1.4.2 Papel de las células musculares lisas

Las células musculares lisas son el componente mayoritario (90% del contenido celular) de las lesiones ateroscleróticas iniciales (Wissler et al. 1990) y también son importantes en la neointima de las lesiones restenóticas (Ip et al. 1990). En la restenosis que se produce tras la introducción de un catéter en el vaso sanguíneo, la neointima se forma básicamente por células musculares lisas que migran de la media a la íntima (Clowes et al. 1986). En cambio, en la aterosclerosis, la respuesta inflamatoria empieza la acumulación de la neointima con los monocitos y linfocitos, seguida de la migración y proliferación de las células musculares lisas (Ross 1993, 1999). En las lesiones ateroscleróticas avanzadas, la fracción de células musculares lisas que proliferan es muy pequeña (inferior al 1%) y predomina la matriz extracelular producida por estas células (Wight, 1995; Figura 1.12).

Las células musculares lisas de la capa media son activadas por las moléculas secretadas por el resto de las células implicadas en la lesión aterosclerótica con lo que se produce un cambio fenotípico: las células musculares lisas de fenotipo "contráctil" no proliferativo se transforman en células de fenotipo "sintético" que proliferan, migran atraídas por distintos agentes quimiotácticos y producen matriz extracelular (colágeno, elastina y PGs). Las células musculares lisas de fenotipo "contráctil" presentan miofilamentos y el retículo endoplasmático rugoso así como el aparato de Golgi poco desarrollados, mientras que las células musculares lisas de fenotipo "sintético" se caracterizan por una abundancia de retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi y presentan pocos miofilamentos (Thyberg et al. 1990). Se activa la

expresión de genes que codifican receptores para el PDGF y se estimula la producción de factores de crecimiento (PDGF, IGF-1, etc) y citocinas (TGF- β , IL-1) que modulan la propia actividad de las células musculares lisas y la de las células que intervienen en la aterogénesis.

En la Figura 1.10, se resumen algunos de los factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas por medio de las cuales se modulan entre sí las actividades de las células musculares lisas, células endoteliales, linfocitos y monocitos/macrófagos.

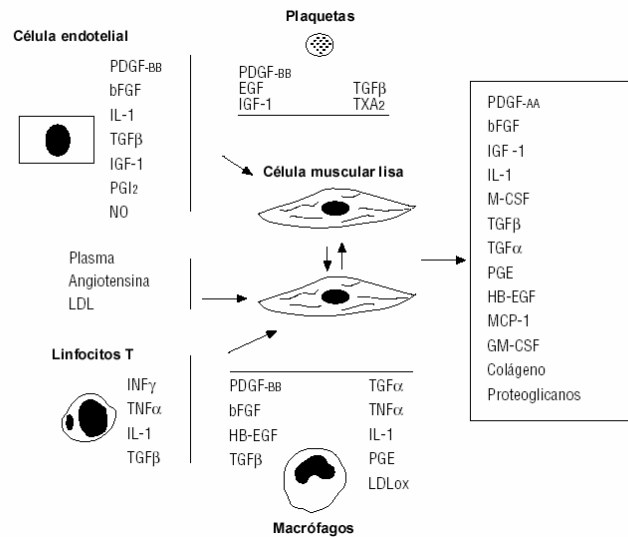


Figura 1.10. Activación de las células musculares lisas por factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas sintetizadas por diferentes células que participan en la aterogénesis (células endoteliales, plaquetas, células musculares lisas, linfocitos T y macrófagos; Martínez-González et al. 2001).

La rotura de la placa aterosclerótica provoca la rotura del endotelio y la exposición de estructuras de la pared vascular que producen la formación del trombo (Badimon et al. 1992). Las plaquetas al agregarse liberan el contenido de sus gránulos α que llevan PDGF y otras moléculas que inducen la proliferación y migración de las células musculares lisas (Figura 1.11). Las células musculares lisas proliferan en la media y migran hacia la íntima donde proliferan activamente.

La migración de las células musculares lisas está controlada por un conjunto de moléculas tales como el bFGF, PDGF, EGF, la trombina, la angiotensina II, etc. (Ross, 1993). Estos mitógenos inducen la expresión de proteasas (plasmina y metaloproteasas) que degradan la matriz extracelular y facilitan la migración de las células musculares lisas. Por otro lado, el PDGF, la trombina y la angiotensina II también son fuertes inductores de la proliferación de las células musculares lisas.

Las células musculares lisas que proliferan activamente sintetizan PGs que interaccionan con las LDL y favorecen su agregación y captación por las células musculares lisas y los macrófagos (Tertov et al. 1992; Tabas et al. 1993). Las células musculares lisas también se convierten en células espumosas porque contienen receptores "scavenger" (Inaba et al. 1992) y receptores LRP (Llorente-Cortés et al. 2002) a través de los cuales captan LDL oxidadas.

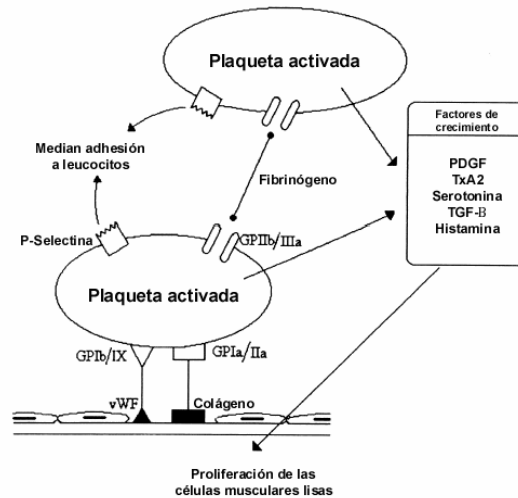


Figura 1.11. Representación esquemática de los factores implicados en la formación de la neointima después de una lesión vascular. TxA2: tromboxano A2; vWF: factor de von Willebrand; GP: Glicoproteína. (Chandrasekar y Tanguay, 2000).

1.4.3 Proteoglicanos de los vasos sanguíneos

La matriz extracelular de los vasos sanguíneos es una mezcla de fibras de colágeno y fibras elásticas inmerso en un gel de proteoglicanos, ácido hialurónico, glicoproteínas y agua. La composición de la matriz extracelular de cada capa del vaso está controlada por la regulación coordinada y diferencial de la síntesis y del "turnover" de cada uno de sus componentes (Wight, 1996).

Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales, células musculares lisas y matriz extracelular cuya composición varía entre las diferentes capas del vaso sanguíneo. Las diferentes capas del vaso se organizan de forma concéntrica: **la íntima**, está formada por un revestimiento de células endoteliales con una matriz extracelular en el subendotelio enriquecida en proteoglicanos (entre ellos el ácido hialurónico); la **media**, separada de la íntima por una densa membrana elástica (lámina elástica interna) y compuesta de células musculares lisas inmersas en una matriz extracelular de elastina, colágeno y proteoglicanos; y la **adventicia**, separada de la media por la lámina elástica externa y formada por colágeno, fibroblastos y capilares sanguíneos (*vasa vasorum*) que nutre la pared vascular.

Los PGs y el ácido hialurónico son moléculas hidrofílicas que proporcionan viscosidad, elasticidad y turgencia a los vasos sanguíneos. Los PGs interaccionan con moléculas que participan en la regulación de la permeabilidad vascular, en el metabolismo de lípidos, hemostasis y trombosis (Wight, 1989; Radhakrishnamurthy et al. 1990; Jackson et al. 1991; Wight et al. 1992; Camejo et al. 1993; Williams y Tabas, 1995). Además, los PGs y el ácido hialurónico interaccionan con las células de los vasos sanguíneos y con factores de crecimiento y citocinas para modificar la adhesión, migración y proliferación celular.

<p>Fibras de colágeno Colágeno tipo I Colágeno tipo III Colágeno tipo V Colágeno tipo VI (no fibrilar) Colágeno tipo XVIII</p> <p>Glicoproteínas Fibrilina (ensambla fibras elásticas) Emilina (ensambla fibras elásticas) Fibronectina (une colágeno, fibrina y PGs) Trombospondina Tenascina Osteopontina SPARC o osteonectina (une PDGF-BB)</p> <p>Fibras elásticas Elastina</p>	<p>Membranas basales Colágeno tipo IV (no fibrilar) Colágeno tipo VIII (no fibrilar) Laminina (glicoproteína que une colágeno IV y HS) Entactina Perlecano (HSPGs)</p> <p>Proteoglicanos Ácido Hialurónico Versicano (CSPG) Decorina (DSPG) Biglicano (DSPG) Lumicano (KSPG) Perlecano (HSPG)</p>
---	--

Tabla 1.8. Algunos de los componentes de la matriz extracelular de los vasos sanguíneos (Adaptado de Wight, 1996).

Los PGs vasculares se encuentran en:

- la matriz extracelular intersticial
- formando parte de las membranas basales
- las membranas de las células
- PGs intracelulares

Los PGs de los vasos sanguíneos mayoritarios son el versicano (CSPG), los DSPG intersticiales pequeños ricos en residuos Leu (decorina y biglicano), el lumicano (KSPG) y HSPG de membrana basal (perlecano). Todos los PGs se asocian con otros componentes de la matriz extracelular de los vasos. Por ejemplo, la decorina se distribuye junto con las fibras de colágeno y regula el diámetro de las fibras de colágeno y su organización (Wight, 1989). El versicano está presente en todo el espacio intersticial de la matriz donde no se encuentran los componentes fibrilares de la matriz extracelular e interacciona con el ácido hialurónico y otras proteínas de unión (Galis et al. 1992, Yao et al. 1994). El perlecano se inserta en las membranas basales y proporciona permeabilidad, sirve como sustrato para las células de los vasos y retiene factores de crecimiento (Bashkin et al. 1989; Farquhar, 1991; Hayashi et al. 1992). Los PGs más abundantes se representan en la Tabla 1.9.

Familia (ubicación)	Nombre común	Cadenas GAG	Proteína núcleo (kDa)	Función
Intersticiales grandes	Versicano	CS (15-17)	263	Resistencia compresiva
Intersticiales pequeños "leucine-rich"	Decorina	DS (1)	36	Organización colágeno
	Biglicano	DS (2)	38	Adhesión celular
	Lumicano	KS (3-4)	35	Organización colágeno
Membrana Basal	Perlecano	HS (3)	467	Unión de factores de crecimiento
Membrana Celular	Sindecano-1	HS/CS (3-5)	31	Receptores de la matriz extracelular, de lipasas, factores de crecimiento, citocinas, enzimas, etc.
	Fibroglicano (sindecano-2)	HS (3)	20	Adhesión celular
	N-sindecano (sindecano-3)	HS/CS (3)	35	Desarrollo de neuritas
	Riudocano (sindecano-4)	HS (3)	20	Adhesión en contactos focales
	Glipicano	HS (3)	62	Une VEGF y aumenta su actividad

Tabla 1.9. Algunos de los PGs presentes en la matriz extracelular de los vasos sanguíneos (Adaptado de Wight, 1996).

La distribución de los PGs a través del vaso sanguíneo es variable. Así, la íntima presenta mayor cantidad de PGs que la media y la adventicia (Wight, 1989; Stary, 1990; Merrilees y Beaumont, 1993). Los complejos de versicano y ácido hialurónico y el biglicano son prominentes en la íntima y en la media y la decorina se concentra en la adventicia que contiene colágeno. El perlecano está presente en las membranas basales en la íntima y en la media.

Los PGs también están presentes en la membrana de las células de los vasos sanguíneos. Son PGs que presentan un dominio hidrofóbico en la proteína núcleo que les permite el anclaje a la membrana como el caso de familia de los sindecanos, un tipo de HSPGs (Bernfield et al. 1992, Cizmeci-Smith et al. 1992, Kojima et al. 1992). También se encuentran los glipicanos, que son una familia de HSPGs que se asocian a la membrana a través de un grupo GPI (Mertens et al. 1992). Los PGs de membrana presentan una variedad de funciones tales como la unión de enzimas que intervienen en el metabolismo de lípidos y en la coagulación sanguínea, unión de factores de crecimiento y citocinas y el anclaje de las células a la matriz extracelular.

1.4.3.1 Biosíntesis

La célula muscular lisa es la principal fuente de PGs y de ácido hialurónico y modulan la síntesis de PGs en los diferentes estadios fenotípicos. Se ha descrito que los PGs aislados de las células musculares lisas en fase de proliferación presentan cadenas de GAGs más largas y unen con mayor afinidad a las LDL que los PGs aislados de células musculares lisas no

proliferativas (Camejo et al. 1993). *In vitro*, las células musculares lisas humanas en fase de proliferación, aumentan la síntesis de PGs (sobre todo HS y CS) que las mismas células en estado de quiescencia (Fager et al. 1995, Tao et al. 1997). Además, la síntesis de estas moléculas está regulada de forma diferencial por factores de crecimiento y citocinas tales como el PDGF, el TGF- β 1 y la IL-1 (Chen et al. 1991; Schönherr et al. 1991, 1993; Edwards et al. 1994). Así, se ha descrito que el PDGF y el TGF- β aumentan la síntesis del versicano (Kähäri et al. 1991, Schönherr et al. 1991) y del biglicano (Schönherr et al. 1993) por parte de las células musculares lisas. El PDGF estimula la síntesis de versicano y ácido hialurónico que forman agregados y facilitan la migración y proliferación de las células musculares lisas (Evanko et al. 1999, 2001).

Las células endoteliales también varían la expresión de PGs según su estadio fenotípico. Así, cuando las células endoteliales se vuelven migratorias, disminuye la síntesis de HS y aumenta la síntesis de DS (Kinsella et al. 1997). Las células derivadas de la sangre, tales como las plaquetas, mastocitos, linfocitos y monocitos también sintetizan PGs. Los mastocitos sintetizan heparina y la diferenciación de los monocitos a macrófagos también es acompañada de un incremento en la síntesis de HS y CS que contienen un elevado número de grupos sulfato (Edwards et al. 1995).

1.4.4 Proteoglicanos en la enfermedad arterial

El contenido y distribución de los PGs de los vasos sanguíneos cambia cuando la matriz extracelular de los vasos es remodelada en la hipertensión, diabetes, aterosclerosis y restenosis. En general, la síntesis de PGs y ácido hialurónico aumentan en las fases temprana y media de la enfermedad vascular y disminuye cuando las lesiones son más avanzadas y fibróticas aunque la matriz extracelular se va acumulando lo que produce una disminución en el diámetro del lumen del vaso (Wight, 1996).

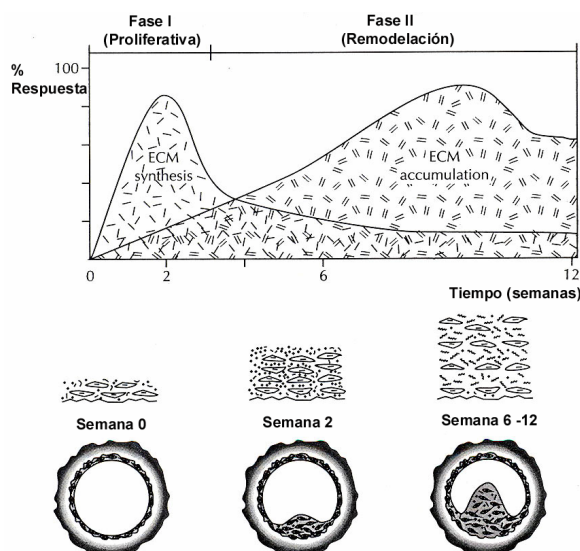


Figura 1.12. Los cambios de la matriz extracelular después de producirse la lesión vascular y las consecuencias de estos cambios en el desarrollo de la neointima (Wight, 1995).

Se observan cambios en la distribución de los diferentes tipos de PGs en el desarrollo de las lesiones (Nikkari et al. 1994; Wight, 1996; Raines, 2000; Bingley et al. 2001). Así, en lesiones en primates con hipercolesterolemia se observa un fuerte marcaje de decorina, biglicano, versicano y ácido hialurónico en lesiones intermedias y avanzadas. La decorina (DSPG) se localiza básicamente en regiones ricas en macrófagos (Radhakrishnamurthy et al. 1998) y el versicano (CSPG) está presente en áreas en las que prevalecen las células musculares lisas (Evanko et al. 1998). Se ha demostrado la importancia del versicano en el desarrollo de la aterosclerosis (Wight et al. 1992). También se observan depósitos de versicano (Wight et al. 1997) y biglicano (Riessen et al. 1994) en la matriz extracelular de vasos sanguíneos humanos en restenosis.

Los depósitos de PGs se distribuyen de forma similar a algunos factores de crecimiento, lo cual sugiere una interrelación entre ellos. Así, la decorina (DSPG) y el biglicano (DSPG) colocalizan con el TGF- β 1 en la región rica en macrófagos mientras que el versicano (CSPG) y el ácido hialurónico son abundantes en la matriz extracelular de las células que producen PDGF y TGF- β 1 (Evanko et al. 1998).

En lesiones avanzadas, el perlecano (HSPG) aumenta su expresión en la neoíntima, donde presenta un papel inhibitorio de la proliferación de las SMC inducida por el PDGF-BB entre otros factores (Kinsella et al. 2003). Se ha descrito también que los PGs de superficie celular: el sindecano-1 y el sindecano-4 aumentan en la lesión vascular (Cizmeci-Smith et al. 1997). A nivel molecular, se han descrito cambios relacionados con la edad en la estructura de los HS de la aorta humana. Se ha observado un aumento en la sulfatación del disacárido: **Ido-A (2-O-SO₃)- GlcNSO₃(6-O- SO₃)** que está relacionado con un incremento en la unión del PDGF-AA_L y PDGF-BB_L (Feyzi et al. 1998).

	Capa media normal	Aterosclerosis		
		Células musculares lisas	Macrófagos	Cubierta fibrosa
PROTEOGLICANOS				
Biglicano (DSPG)	++	+++	+	-/+
Decorina (DSPG)	++	+	+++	+
Glipicano (HSPG)	+			
Ácido hialurónico	+	+++	+++	+++
Perlecano (HSPG)	++	+++	++	+
Sindecano (HSPG)	+	+		
Versicano (CSPG)	++	+++	-	+++

Tabla 1.10. Comparación de los proteoglicanos presentes en la matriz extracelular de la capa media de vasos sanguíneos sanos y con lesión aterosclerótica (Adaptado de Raines, 2000).

Los cambios en la matriz extracelular afectan a la permeabilidad de los vasos sanguíneos ya que se crea una red con cargas negativas que interaccionan con macromoléculas como las lipoproteínas y que provocan su acumulación en los vasos sanguíneos. Además, se observa que los PGs de la matriz extracelular de los vasos sanguíneos tienen un papel de vital importancia en la retención de las lipoproteínas (revisado en Chait y Wight, 2000; Borén et al.

2000). El biglicano (DSPG) es el PG que presenta mayor colocalización con las apolipoproteínas E, A-I y B (O'Brien et al. 1998). Se ha descrito que aumentos en la longitud de las cadenas de GAGs y el grado de sulfatación incrementan la interacción de los PGs con las lipoproteínas (Camejo et al. 1993; Cardoso y Mourao, 1994). Así, estudios *in vitro* indican que el versicano (CSPG) que contiene largas cadenas de GAGs presenta mayor afinidad por la LDL (mayor número de sitios de unión) que la decorina y el biglicano (Chang et al. 2000). La lipoproteína lipasa (LPL) (revisado en Williams y Tabas, 1995) y apo E (O'Brien et al. 1994) son proteínas que sirven de puentes para la interacción de las lipoproteínas con los PGs de tipo HS. Los complejos de lipoproteínas y PGs son internalizados por macrófagos (Buton et al. 1999) y células musculares lisas (Ismail et al. 1994) lo que permite su transformación en células espumosas que contribuyen a la evolución de la lesión.

Algunos PGs pueden servir como agentes protectores de la aterosclerosis y trombosis. Por ejemplo, algunas formas de heparina, el HS y DS son potentes anticoagulantes y previenen la generación de fibrina y por tanto el desarrollo de la trombosis. De esta manera, se han utilizado terapéuticamente en la prevención de la trombosis y embolia (Marcum y Rosenberg, 1987; Bourin y Lindahl, 1993; Cadroy et al. 1993). También se ha descrito que la heparina (tanto en su forma anticoagulante como no-anticoagulante; Wright et al. 1989a y 1989b, Nikkari y Clowes, 1993) y los HS (Bingley et al. 1998) bloquean la migración y proliferación de las células musculares lisas en la formación de la neointima que aparece después de la angioplastia en modelos experimentales con animales.

Los cambios en la matriz extracelular de los vasos pueden a su vez generar cambios fenotípicos en las células que forman parte de estos vasos ya sea promoviendo la desadhesión de las células de la matriz extracelular, favoreciendo que las células puedan migrar y proliferar e induciendo la unión de las células a otras proteínas de la matriz extracelular (Evanko et al. 1999, 2001).

1.4.5 PDGF en la aterosclerosis

Se ha observado un aumento en la expresión del PDGF y de los receptores del PDGF en la aterosclerosis ya sea inducida experimentalmente en modelos animales (lesión inducida por introducción de un catéter; Kanzaki et al. 1994, Uchida et al. 1996) o en procesos naturales de formación de la placa aterosclerótica (Libby et al. 1988, 1989; Wilcox et al. 1988), en la restenosis que sigue a una técnica de revascularización como la angioplastia (Ueda et al. 1996) o en la neointima que se forma tras la implantación de un injerto (Golden, 1991; Akyürek et al. 1996, Lemström y Koskinen, 1997). Estos resultados sugieren la importancia del PDGF producido por macrófagos, células musculares lisas, células endoteliales o liberado por las plaquetas en la formación de la lesión (ver 1.4.1 y 1.4.2).

El análisis inmunohistoquímico de las lesiones ateroscleróticas humanas ha demostrado que hay un aumento en la producción de PDGF-AB y -BB y también un aumento en la expresión del receptor PDGF β (Rubin et al. 1988, Ross et al. 1990, Irvine et al. 2000). El receptor PDGF β parece ser más importante que el receptor PDGF α en el desarrollo de la aterosclerosis (Giese et al. 1999). Además, las células musculares lisas expresan mayor cantidad de receptores PDGF β , lo que sugiere un papel más importante del PDGF-BB en la proliferación de las células musculares lisas (Raines y Ross, 1993).

En la restenosis que aparece tras la angioplastia de arterias coronarias humanas se ha observado un incremento en la expresión del receptor β del PDGF en las células musculares lisas que intervienen en la formación de la neointima y también un incremento en la producción de PDGF-AB y -BB en los macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas (Tanizawa et al. 1996, Ueda et al. 1996).

La elevada expresión de PDGF y de sus receptores se debe también en parte a la disminución de flujo sanguíneo. Así, en modelos en conejo y babuino, una disminución en el flujo sanguíneo se asocia a un incremento en la producción de PDGF por parte de las células endoteliales y un aumento en la expresión de los receptores de PDGF por parte de las células musculares lisas (Kraiss et al. 1996, Mondy et al. 1997).

1.4.6 Antagonistas del PDGF

Se han desarrollado distintos antagonistas del PDGF que actúan a diferentes niveles: la unión al ligando, la dimerización del receptor del PDGF, la activación del receptor tirosina quinasa, etc. (revisión Östman y Heldin, 2001). En general, los receptores tirosina quinasa presentan mayor diversidad en los dominios extracelulares que en los dominios tirosina quinasa, por lo que los antagonistas específicos de los receptores de PDGF están dirigidos contra la unión ligando-receptor o interacción receptor-receptor. Los antagonistas obtenidos genéticamente, tales como las formas dominantes negativas del ligando o receptor o los "antisense" del ligando o receptor han resultado útiles en la supresión de la señalización mediada por el PDGF.

- Anticuerpos monoclonales y policlonales neutralizantes de las diferentes isoformas de PDGF producidos en varias especies animales: conejo, cabra, oveja y ratón (Thyberg et al. 1990, Vassbotn et al. 1990, Ferns et al. 1991, Rutherford et al. 1997b). También se han producido anticuerpos monoclonales neutralizantes de los receptores de PDGF α y β (LaRochelle et al. 1993; Ramakrishnan et al. 1993; Tiesman y Hart, 1993; Koyama et al. 1994, 1996a, 1998; Lokker et al. 1997).
- Aptámeros SELEX. Son moléculas inhibitorias que se han producido contra muchas proteínas, entre ellas varios factores de crecimiento. Su mecanismo de acción es similar al de los anticuerpos neutralizantes porque se unen a la proteína e interfieren en la unión con el receptor (Floege et al. 1999). Se han generado tres aptámeros contra el PDGF-AB y el PDGF-BB, que neutralizan la replicación del DNA inducida por éstas isoformas (Green et al. 1996).
- Receptores de PDGF solubles (Duan et al. 1991, Rooney et al. 1994, Miyazawa et al. 1998).
- Péptidos lineales o cíclicos que contienen secuencias de los dominios de la cadena de PDGF-B que interaccionan con su receptor (Engström et al. 1992, Brennand et al. 1997).
- Anticuerpos que bloquean la fosforilación en los receptores de PDGF que se produce tras su dimerización (Lokker et al. 1997, Omura et al. 1997, Shulman et al. 1997).
- Inhibidores tirosina quinasa de bajo peso molecular. Se han generado inhibidores específicos que reconocen una secuencia de hasta 18 aminoácidos alrededor de los residuos tirosina quinasa. Se han generado distintos inhibidores (CGP53716 (Buchdunger et al. 1995); STI-571 (Buchdunger et al. 1996); Ki6896 (Yagi et al. 1998); RPR101511A (Bildler et al. 1999); AG1295 (Kovalenko et al. 1994) y SU101 (Shawver et al. 1997)) que no distinguen entre el receptor α o β del PDGF.
- Transferencia genética de formas dominantes negativas del gen del PDGF (Mercola et al. 1990, Vassbotn et al. 1993) o de su receptor (Ueno et al. 1991).
- Transferencia por adenovirus del gen que codifica el dominio extracelular del receptor β del PDGF (Deguchi et al. 1999).

1.4.6.1 Antagonistas del PDGF en el tratamiento de la aterosclerosis

Hay varias evidencias de la importancia del papel del PDGF en el desarrollo de la aterosclerosis. Así, una infusión de PDGF-BB en ratas después de una lesión en la carótida (Jawien et al. 1992) o la expresión de PDGF-BB recombinante en arterias de cerdo (Nabel et al. 1993) producen engrosamiento de la íntima. Se ha observado en experimentos con conejos sometidos a una dieta rica en colesterol que la adición de anticuerpos anti-PDGF BB disminuye el desarrollo de las lesiones en la aorta (Rutherford et al. 1997a).

Se han utilizado anticuerpos de PDGF neutralizantes de la formación de la neointima que aparece tras una lesión en la carótida de rata y se ha observado una disminución del 50% en la formación de la neointima (Ferns et al. 1991). Similares efectos se han obtenido en el mismo modelo animal utilizando oligonucleótidos "*antisense*" del receptor β del PDGF (Sirois et al. 1997), utilizando también el inhibidor tirosina quinasa CGP53716 del receptor de PDGF (Myllärniemi et al. 1997,1999), los aptámeros SELEX del PDGF (Lepänen et al. 2000) y con la transferencia por adenovirus del gen que codifica la forma soluble del receptor β del PDGF (Deguchi et al. 1999).

En el modelo porcino de restenosis, se han utilizado nanopartículas que liberan el inhibidor tirosina quinasa AG1295 y se ha observado una reducción de la proporción entre la íntima/media (Banai et al. 1998).

En modelos de restenosis en babuinos, se han reducido las lesiones con anticuerpos monoclonales del receptor β del PDGF pero no con anticuerpos monoclonales del receptor α (Giese et al. 1999). También se han realizado con éxito tratamientos con anticuerpos del receptor de PDGF β junto con infusiones continuas de heparina (Hart et al. 1999).

También se ha utilizado inhibidores tirosina quinasa del receptor de PDGF (CGP53716) para prevenir la formación de la neointima que se produce tras el trasplante de injertos entre diferentes especies (Sihvola et al. 1999).

La mayoría de los estudios en modelos animales parecen indicar que PDGF-AB y PDGF-BB a través de los receptores β son los principales activadores de la migración y proliferación de las células musculares lisas en la restenosis y en las lesiones producidas tras el trasplante entre distintas especies. Sin embargo, otros factores parecen estar también implicados ya que se ha visto que una combinación de anticuerpos antagonistas del PDGF y del FGF resultan en una inhibición del 84% del engrosamiento de la íntima en el modelo de lesión en la carótida de rata (Rutherford et al. 1997b).

En el tratamiento de la restenosis se han utilizado drogas que inhiben la liberación del PDGF de las plaquetas como el naftidrofuryl y el indometacin (Barradas et al. 1994) y otras drogas que interfieren en la unión del PDGF a su receptor: trapidil (Okamoto et al. 1992, Maresta et al. 1994).