

Angiogénesis Coronaria como Respuesta Endógena de la Isquemia Miocárdica en el Adulto

Gabriel Lorier¹, Cristina Touriño¹, Renato A. K. Kalil^{2,3}

Universidade de La Republica, Montevideo, Uruguay (UDELAR)¹; Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Fundação Universitária de Cardiologia - (IC/FUC)²; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - (UFCSPA)³, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Resumen

El proceso de angiogénesis involucra una serie compleja de estímulos y de respuestas integradas, como la estimulación de las células endoteliales (CE), para su proliferación y migración, estimulación de la matriz extracelular, para la atracción de pericitos y macrófagos, estimulación de las células musculares lisas, para su proliferación y migración, y formación de nuevas estructuras vasculares.

La angiogénesis es principalmente una respuesta adaptativa a la hipoxia tisular y depende de la acumulación del factor de crecimiento inducido por la hipoxia (FIH-1 α) en la zona del miocardio isquémico, que sirve para aumentar la transcripción del factor de crecimiento endotelial vascular (con sus siglas en inglés: VEGF vascular endotelial growth factor), y sus receptores VEGF-R, por las CE en el sufrimiento isquémico.

Esos pasos aglutinan mecanismos enzimáticos y proteasas activadoras del plasminógeno, metaloproteinasas (MMP) de la matriz extracelular (MEC), y cinasas que provocan la degradación molecular proteolítica de la MEC, como también la activación y la liberación de factores de crecimiento, tales como: factor básico de crecimiento de los fibroblastos (FCFb), VEGF y factor de crecimiento insulínico-1 (FCI-1). Posteriormente, viene la fase intermedia de estabilización del nuevo brote neovascular inmaduro y la fase final de maduración vascular de la angiogénesis fisiológica.

Como conclusiones generales, podemos afirmar que la angiogénesis coronaria en adultos es fundamentalmente, una respuesta paracrina de la red capilar preexistente en condiciones fisiopatológicas de isquemia e inflamación.

Introducción

En esta revisión, traemos a colación la angiogénesis miocárdica endógena en el adulto, bajo un prisma unificado de los diversos mecanismos moleculares ya descritos. Esa visión se basa en

la interpretación “dinámica” de la definición refrendada por Folkman: “La angiogénesis es la generación y la expansión de los vasos sanguíneos a partir de una red vascular preexistente, bajo estímulos endógenos o exógenos”¹. En el adulto, la angiogénesis es en gran medida, una respuesta adaptativa a la hipoxia tisular y ocurre en una amplia variedad de situaciones, que van desde el desarrollo embrionario hasta el crecimiento tumoral².

Como mediador de la cascada de eventos celulares y moleculares, está la activación del FIH-1, que sirve para aumentar la transcripción por las CE, en el sufrimiento isquémico, del VEGF y sus receptores VEGF-R³.

Creemos que la red capilar preexistente es el lugar de inicio común para el desarrollo y la generación de los nuevos capilares, intermediada por los diferentes sistemas de signos que desencadenan la producción de factores de crecimiento y que terminan induciendo a la proliferación de las células endoteliales. La definición de angiogénesis hecha por Folkman, ya citada, se basa en sólidos elementos anátomo-morfométricos.

La relación capilar/fibra miocárdica normal en el corazón del adulto es de 1 para 1, o sea, un capilar por fibra miocárdica. El calibre máximo de nuevos vasos identificados en el proceso de angiogénesis es de 200 μ m de diámetro⁴. Si no hay una circulación coronaria epicárdica de alimentación de esa circulación colateral con un flujo sanguíneo adecuado, es posible que ocurra la regresión paulatina del proceso de angiogénesis. A su vez, cada fibra del miocardio tiene un diámetro que varía de 10 a 25 μ m y su largura también varía de 50 a 100 μ m, con una distribución capilar uniforme en la pared ventricular izquierda de 3.000 para 4.000/cm²⁵.

Por tanto, podemos decir que esa definición posee una fuerte sustentación morfométrica. Eso significa que, en el corazón adulto normal en reposo, para que se mantenga la vida celular, debe existir una fuente de nutrientes para el corazón. En otras palabras, las células progenitoras endoteliales circulantes (CPEC), necesitan una circulación coronaria preexistente para llegar a la región en que ocurre la isquemia miocárdica.

Al analizar el segundo componente de la definición de Folkman, cuando dice: “[...] por estímulos endógenos o exógenos...”, verificamos que se extendió a los dos principales mecanismos del proceso de la angiogénesis: la endógena son los procesos fisiológicos y patológicos, mientras que la exógena es la terapia angiogénica cardiovascular como forma exógena de inducción de la angiogénesis. El objetivo de esta revisión es analizar los mecanismos de la angiogénesis endógena en los procesos fisiológicos.

Palabras clave

Isquemia miocárdica, neovascularización fisiológica, células endoteliales, adulto.

Correspondencia: Renato Abdala Karam Kalil •

Av. Princesa Isabel, 370 - 90620-000 – Santana, Porto Alegre, RS, Brasil
E-mail: kalil.pesquisa@cardiologia.org.br, editoracao-pc@cardiologia.org.br
Artículo recibido el 24/03/11; revisado recibido el 13/06/11; aceptado el 04/07/11.

I. Fases de la Regulación de los Mecanismos Inductores de la Angiogénesis Miocárdica Endógena en el Adulto:

1. Fase inicial: isquemia miocárdica como estímulo inicial

La angiogénesis es principalmente, una respuesta adaptativa a la hipoxia tisular y depende de la acumulación de FIH-1 α , que, en condiciones de hipoxia tisular, activa la expresión de factores de crecimiento e inicia el proceso de angiogénesis en la región isquémica a partir de la red coronaria preexistente⁶. Además, la atracción y el reclutamiento de CPEC y de macrófagos activan, de forma paracrina, la angiogénesis en esa región⁷. La expresión del VEGF-A es un indicativo del reclutamiento de los progenitores mieloides en el miocardio isquémico, mientras que las células perivasculares de la angiogénesis están intermediadas por los factores derivados de las células estromales (FDE)-1 (Figura 1)⁸.

En la cardiopatía isquémica, tanto FIH-1 α como VEGF-A, están presentes en la placa arteriosclerótica, lo que indica que el FIH, por vía de la señalización angiogénica, está directamente involucrado en el crecimiento de la placa arteriosclerótica⁹.

La isquemia miocárdica grave conlleva a la acumulación de FIH-1 y a la expresión de factores que estimulan brotes

angiogénicos en las cercanías de los vasos sanguíneos en el miocardio isquémico. No nos podemos olvidar que la isquemia grave y persistente causa apoptosis de la CE y de las fibras miocárdicas. Además, los progenitores mieloides y endoteliales derivados de la médula ósea también son reclutados para participar activamente en el apoyo a la angiogénesis¹⁰.

El FIH-1 α es muy importante para la angiogénesis en el miocardio. Sin embargo, poco se sabe respecto del FIH-2 α . Los cardiomiocitos privados de FIH-1 α específicos fueron llevados a la reducción de la vascularización, alteraciones en el metabolismo energético y anomalía de la función contráctil. En contrapartida, la superexpresión de la proteína de fusión FIH-1 α /VP16 (FIH-1 α del ADN vinculante y activador de dominio vinculado con la heterodimerización VP16), fue capaz de promover la angiogénesis y de reducir el tamaño del infarto en un modelo experimental en ratones. Tal como ocurre en otros tejidos hipóxicos, el FIH-1 α es esencial para el aumento de la concentración en la médula ósea, de los precursores de CE. Incluso una deficiencia parcial de FIH-1 α , proveniente del envejecimiento, está asociada a una reducción significativa de la concentración de esas células, y a una vascularización pobre en el músculo isquémico¹¹.

La hipoxemia también regula la producción y la expresión del VEGF, en razón del aumento de la transcripción del FIH-1 y del aumento en la estabilidad del VEGF-dependiente de la región 3 del ARNm¹¹.

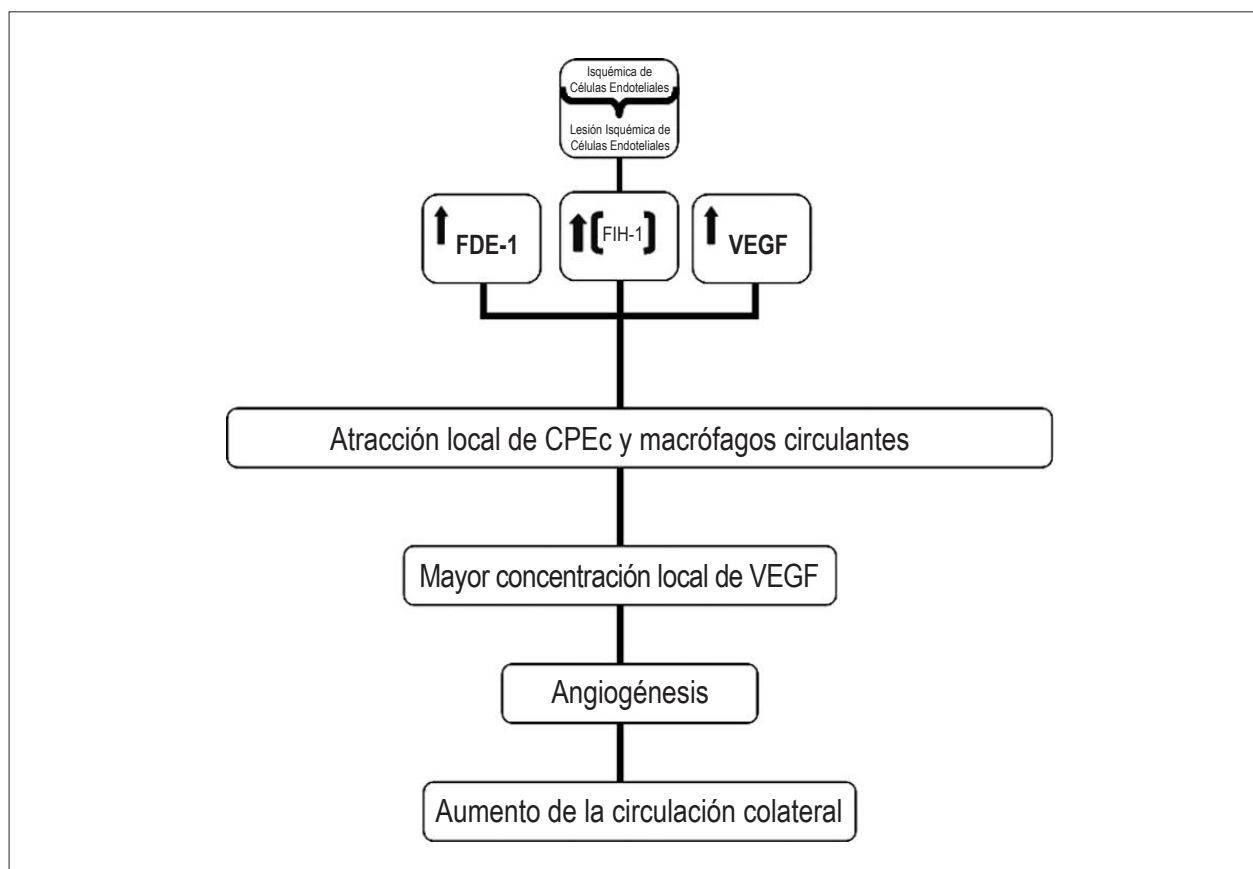


Figura 1 – Ilustración de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos determinantes de la angiogénesis miocárdica secundaria a la isquemia.

El mecanismo molecular iniciador de la angiogenesis puede ser impulsado por la privación de oxígeno y de los nutrientes, como la glucosa, que regulan la expresión génica. También observamos, que la hipoxia regula los receptores TIE-2, siendo moduladores de la actividad del VEGF, lo que conlleva las CE a proliferar por los mecanismos de brote o división. De acuerdo con el estándar del signo del VEGF y TIE-2, se puede inducir la angiogenesis por brotes o intususcepción¹². Un hecho importante, de aplicación terapéutica del VEGF, es que la isquemia estimula su expresión, como también la de sus receptores¹³ (Figura 1).

1.1. Mecanismo de angiogenesis por atracción de células-tronco circulantes durante el infarto agudo del miocardio

Durante la isquemia miocárdica, el aumento de la expresión y estabilización de la transcripción de FGF-1, genera una producción local y la liberación por la CE en el sufrimiento isquémico de los factores FGF-1 y VEGF-A¹⁴. El FGF circulante regula muchos genes de la angiogenesis, pero la inducción del VEGF tal vez sea lo que más notamos. FGF aumenta la concentración local de VEGF en hasta 30 veces en pocos minutos. El VEGF estimula la angiogenesis fisiológica y patológica en una respuesta estricta de dosis-dependente⁶. Esos mediadores pueden aumentar la movilización y el reclutamiento de las CPEC en el área isquémica¹⁵.

El aumento de la expresión de FGF-1 es esencial para la regulación de la atracción, migración y retención selectiva en el tejido miocárdico isquémico, de las CPEC o de las CE, con el receptor de superficie 4 de la quemoquina CXCR-4¹⁶. Eso significa que la vía FGF-1 es el mecanismo de unificación del sistema de señalización de la angiogenesis en el contexto del infarto agudo del miocardio (Figura 1).

Esas CPEC, del mismo modo que ocurre con las células mesenquimales de la médula ósea (entre otras), son movilizadas, atraídas y desplazadas de la circulación periférica hacia las áreas de isquemia miocárdica¹⁷.

Existen pruebas de que FGF-1 con el receptor de señal CXCR-4 + desempeña un rol importante en el reclutamiento de células circulantes de la médula ósea en el contexto de una grave isquemia miocárdica. Esa señal es esencial para el reclutamiento de células-tronco en el corazón. El CXCR-4 + es un receptor de superficie celular de la FGF-1, expresado en las CPEC y en las células-tronco circulantes hematopoyéticas (CTHc)¹⁸.

Las CPEC desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la pared vascular endotelial, auxiliando en la reendotelización (cambio fisiológico de las CE), y en la angiogenesis¹⁹.

Pero los niveles de FGF-1 endógeno segregado, se reducen después del IAM y vuelven al nivel normal después del 4º ó 7º días del IAM²⁰.

Las células mesenquimales circulantes derivadas de la médula ósea (CMcMO), son un puente hacia el interior del miocardio isquémico, expresado por el FGF-1, que podrá ser una señal que facilite la migración de las células circulantes y de la médula ósea¹⁷.

Antes se creía que los precursores endoteliales existían solo durante la vida embrionaria. Actualmente, ya se han identificado precursores en la médula ósea y en los vasos periféricos en el adulto. Algunos factores de crecimiento, como

el factor estimulador de colonias de granulocitos (FECG), b-FGF y FGF-1, estimulan su diferenciación y su movilización²¹. Esos precursores de células endoteliales colonizan nuevas áreas de brotes angiogénicos en el adulto, y en el futuro, pueden ser objetos terapéuticos.

Rehman et al²² han cuestionado el origen de esas CPEC y su verdadera incorporación en la pared de los vasos en crecimiento. Ellos descubrieron que la mayor parte de las llamadas CPEC deriva de monocitos/macrófagos, con una pequeña población de células-tronco CD-34⁺/células progenitoras hematopoyéticas solamente, a partir de células tronco/angioblastos. Esos monocitos/macrófagos segregan múltiples factores de crecimiento angiogénicos, que a su vez también generan, con su estimulación paracrina, el crecimiento neovascular²².

El concepto de CPEC es muy interesante, aunque más de una década después de su descubrimiento, aún no hay marcadores específicos de las CPEC y los resultados de los ensayos clínicos todavía son controvertidos. Usando un enfoque proteómico, un reciente estudio muestra que las células con fenotipo de CPEC podrían ser células mononucleares circulantes con la incorporación de micropartículas de plaquetas²³.

Schmeisser et al²⁴ demostraron que el monocito CD-34⁺ puede desarrollar *in vitro* un fenotipo endotelial y tomar forma en una estructura tubular, lo que indica un potencial papel de los monocitos en la angiogenesis²⁴.

Finalmente, Ziegelhoeffer et al²⁵ publicaron un estudio que nos conduce a la conclusión de que, en el organismo adulto, las células-tronco provenientes de la médula ósea no generan un crecimiento vascular por la incorporación en las paredes vasculares, pero sí que lo hacen a través de múltiples efectos paracrinicos de citocinas angiogénicas²⁵.

En resumen, la angiogenesis es un mecanismo fisiológico organizado bajo una restringida regulación, con muchos factores que influyen en el proceso activo a nivel molecular, incluyendo diversos polipéptidos solubles, como VEGF, angiopoietina, FGF, factores de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de crecimiento transformador β (FCT- β), factor de necrosis tumoral (FNT)- α , FECG, entre muchos otros²⁶.

1.2. Mecanismo de la angiogenesis endógena por activación de células-tronco residentes en el corazón

El verdadero papel de ese mecanismo y de la cuantificación de su efecto angiogénico no se conoce a ciencia cierta. Las células-tronco residentes en el miocardio (CTRM), fueron capaces de diferenciarse en los cardiomiocitos, células endoteliales y células musculares lisas²⁷. Esas CTRMs expresan receptores para FGF y para FGF-1, que pueden conllevar al reclutamiento y a la proliferación de las CE y reponer algunas funciones del corazón que han sufrido daño isquémico. De la misma forma ocurre con las células mesenquimales circulantes (MSCc), que son capaces de segregar FGF y FGF-1 en respuesta a la lesión²⁸.

1.3. Proliferación de células endoteliales como respuesta final común de la isquemia miocárdica: generación de brote vascular angiogénico

En los adultos, ese proceso se debe, principalmente, a la hipoxemia, y se encuentra intermediado por la activación de

Flt-1 α , que sirve para aumentar la transcripción del VEGF y de sus receptores VEGFRs².

El VEGF estimula la angiogénesis fisiológica y patológica en una estricta relación dosis dependiente²⁹. El VEGF es una proteína que tiene la característica específica de estimular la replicación de células endoteliales vasculares, esenciales para la angiogénesis³⁰. El VEGF-A se conecta a dos receptores tirosina-quinasa (RTK), VEGFR-1 (flt-1) y VEGFR-2 (KDR, Flk-1). Los receptores tirosina-quinasa flt-1 (VEGF-R1), constituyen la segunda mayor afinidad para el VEGF. Aunque no sea tan específico, el receptor flk-1 no comparte las afinidades con las células del sistema inflamatorio, como por ejemplo, monocitos o células cancerosas, al contrario del receptor flt-1. En un reciente y elegante trabajo de la Universidad de Leuven, se hizo un importante descubrimiento con implicaciones terapéuticas para el futuro, sea cual sea, la relativa especificidad del VEGF-B en términos de su actividad angiogénica en el tejido miocárdico isquémico³¹.

En el mecanismo de la angiogénesis, debido al crecimiento vascular en forma de brote vascular, es posible determinar los siguientes pasos de manera simplificada:

- vasodilatación inicial, proceso que envuelve el óxido nítrico y VEGF³²;
- aumento de la permeabilidad vascular en respuesta al VEGF, como extravasación de proteínas plasmáticas que

funcionan como un soporte para la migración de las células endoteliales (CE). El aumento de la permeabilidad es producido por la formación de fenestraciones órgano-vesiculares y por la redistribución de las moléculas de adhesión celular endotelial plaquetaria³³;

c) degradación proteolítica de la MEC: las proteinasas exponen proteínas de la MEC degradada, como colágeno IV y monómero de colágeno fibrilar, que inducen a la migración de CE y CML³⁴.

Los tres pasos descritos envuelven mecanismos enzimáticos que incluyen la Ang2, un inhibidor de TIE2³⁵, proteasas activadoras del plasminógeno, metaloproteinasas (MMP) de la MEC, y cinasas o familia de las heparinasas.

Todas las proteasas influyen en la angiogénesis a través de la degradación molecular proteolítica de la MEC, y de la activación y liberación del factor de crecimiento, como bFGF, VEGF y IGF1, secuestrado en la matriz extracelular (Cuadro 8 en la Figura 2)³⁶. También ejercen una acción proteolítica o factor de crecimiento transformador (FCT), y la activación proteolítica de quimioquinas angiogénicas como el IL-1. O sea, que durante la remodelación vascular por brotación, ocurre la degradación proteolítica, incluyendo los activadores de plasminógeno como la urocinasa activadora del plasminógeno (UPA) y su inhibidor PAI-1, matriz metaloproteinasas (MMPs) e inhibidores de la metaloproteinasas de los tejidos (TIMPs), heparinasas, quinasas, tirosinasas y cadherinas³⁷.

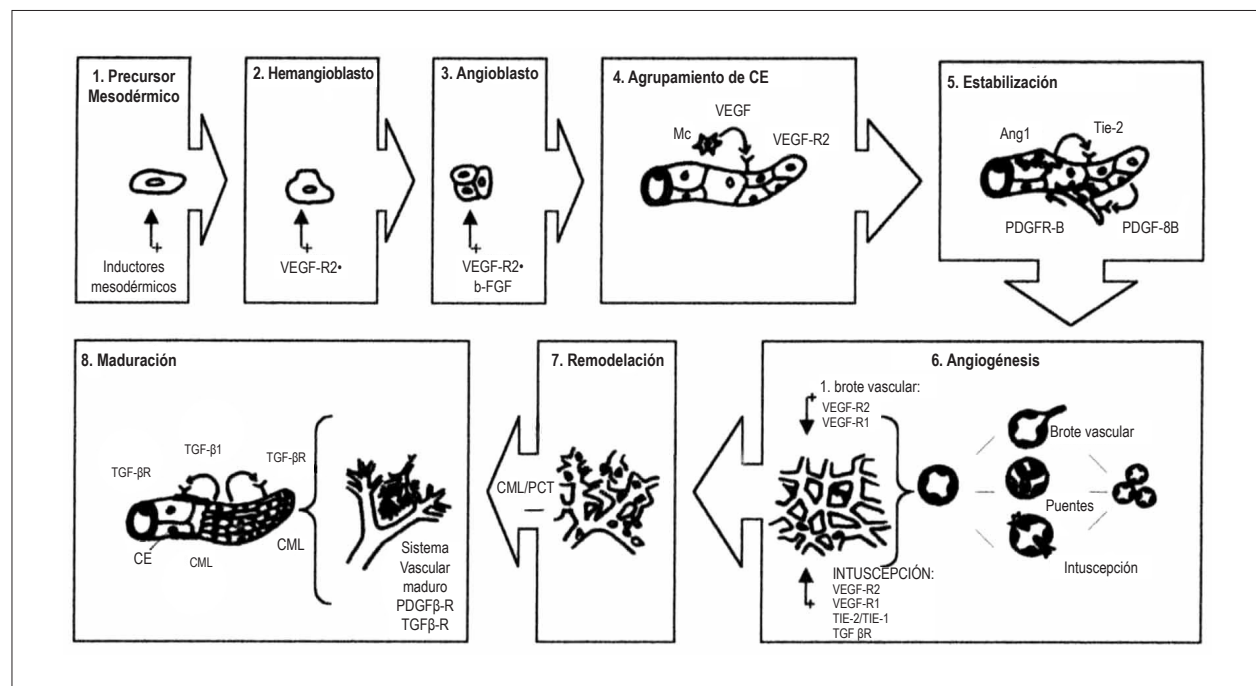


Figura 2 – Formación de los plexos vasculares primarios del mesoderma, durante la fase embrionaria. Los hemangioblastos y la bipotencialidad de sus precursores representa el paso intermedio de los precursores endoteliales (los angioblastos); en la etapa embrionaria, forman la red vascular primitiva llamada vasculogénesis y en la vida adulta, se expanden y se remodelan, conllevando a la angiogénesis (Cuadros 3 y 4). En el Cuadro 5, está la fase de estabilización, representada por la unión de las CE por la acción del VEGF y del FCDP- β , que recluta los pericitos y las células del músculo liso, cubriendo las células endoteliales durante la estabilización del vaso. La angiopoietina – 1 (Ang-1) y FCT-b1 estabilizan el vaso naciente. La Ang-2, en la ausencia de factores de crecimiento, provoca la regresión del brote naciente. En el Cuadro 6, aparecen los procesos angiogénicos de intuscepción y por brote. En los Cuadros 7 y 8, están las fases de remodelación y maduración del vaso naciente. CML: células del músculo liso; PCT: pericitos. Unión del VEGF con las células endoteliales (CE), FCDP- β recluta pericitos (PC). Adaptado de Carmeliet.

Actualización Clínica

Al analizar el papel crítico de la degradación proteolítica de la MEC en el crecimiento y en el mantenimiento del brote angiogénico, deben ser considerados los límites de tiempo de ese proceso. El proceso también debe ser equilibrado, porque una degradación insuficiente impide que las células vasculares dejen sus posiciones originales. Por otro lado, la excesiva degradación trunca el apoyo y la orientación para la migración de las CE y por ende, también la angiogénesis³⁸.

En el proceso de la angiogénesis, una vez producida la degradación proteolítica de la MEC, seguida por la fragmentación de la membrana basal, se produce la migración quimiotáctica de las células endoteliales a través de la membrana basal. Para que eso ocurra, se hace necesario que las conexiones intercelulares endoteliales estén degradadas. Cuando las CE migran para formar nuevos brotes, la MEC sufre una degradación proteolítica y cambios en su composición (Figura 3).

La migración de las CE ocurre 24 horas antes de los siguientes procesos:

- proliferación;
- adhesión y reestablecimiento de contactos intracelulares;
- formación del lumen vascular;
- maduración funcional del endotelio.

Como se puede apreciar, las proteasas desempeñan un rol crítico en el proceso de la angiogénesis³⁹.

La estimulación del VEGF sobre los receptores de la membrana tirosina-quinasa de las células endoteliales vasculares, se expresa a través de miembros de genes Src de la familia de las tirosina-quinasa, como el Src, Fyn, Yes, que regulan múltiples funciones intracelulares. En primer lugar, el Src, Fyn y Yes desempeñan cada uno, un papel único en el sistema de señalización mitogénica del VEGF. En segundo lugar, contribuyen para la modulación del VEGF en la migración celular. En tercer lugar, Fyn desempeña un papel único en la inducción de VEGF para la formación del tubo neovascular. El Fyn tiene un efecto regulador negativo sobre la migración y la estabilización del tubo neovascular inducido por el VEGF. Esos resultados suministran pruebas directas de que

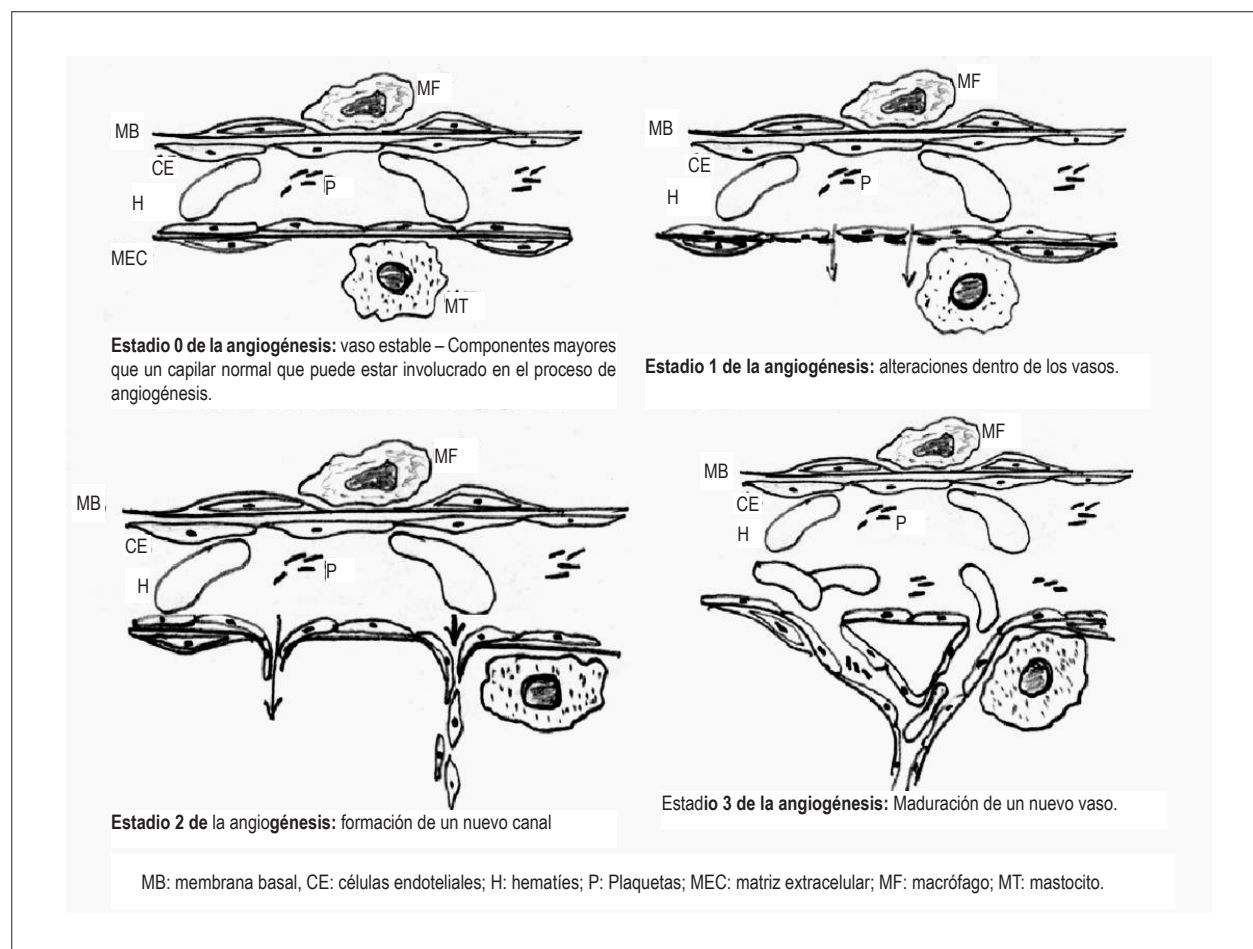


Figura 3 – Esquema detallado del proceso de la angiogénesis, que aparece en el estadio 1: dilatación del vaso, activación de las células endoteliales, activación de las plaquetas, secreción de los activadores del plasminógeno y enzimas proteolíticas, desgranulación de mastocitos, activación de macrófagos, ruptura de la membrana basal y aumento de la permeabilidad con la salida de la fibrina y otras proteínas; en el estadio 2: formación de pseudópodos, degradación de la matriz extracelular, migración de células endoteliales para el espacio extravascular con su proliferación y formación de brotes de tejido vascular; y en el estadio 3: nueva membrana basal y maduración de la nueva pared vascular para el establecimiento del flujo sanguíneo, formación de tubos y conexiones, además de nuevos vasos.

Src, Fyn y Yes tienen un importante papel en la regulación del VEGF en los eventos mediados por las células endoteliales⁴⁰.

La existencia de tubos con pericitos refleja el rápido inicio de la participación del pericito en la angiogénesis intusceptiva (ver Cuadro 4 de la Figura 2). La creación de una red vascular funcional exige que los brotes vasculares emergentes maduren y permanezcan funcionales a lo largo del tiempo. La asociación del pericito y del CML con los brotes de reciente formación de las CE, regula su proliferación, supervivencia, migración, diferenciación, ramificación vascular, flujo sanguíneo y permeabilidad vascular. La participación rápida de los pericitos en el desarrollo de la microvasculatura tiene importantes implicaciones para la intervención terapéutica en muchas enfermedades⁴¹.

El flujo sanguíneo, con su presión sobre la nueva pared vascular, interactúa de forma integrada y dinámica con el citoesqueleto y la MEC. El flujo sanguíneo continuo estimula la proliferación de las células endoteliales y regula el VEGF, integrina $\alpha V\beta 3$, PECAM-1 y VE-cadherina. La tensión de cizallamiento ("shear stress"), estimula la proliferación de las células endoteliales y por ende, aumenta el diámetro del vaso⁴².

La MEC suministra los contactos necesarios entre las CE y los tejidos circundantes, impidiendo que los brotes neovasculares se degeneren. Una matriz de colágeno intersticial y elastina entre las células vasculares, ofrece propiedades de viscoelasticidad y resistencia a la pared del vaso. La MEC también regula la formación del nuevo brote vascular. Cuando las células endoteliales migran para formar nuevos brotes vasculares, la matriz no solo se rompe proteolíticamente, sino que también su composición se altera. Las proteinasas exponen nuevos epítomos en las proteínas de la MEC (por ejemplo, el colágeno IV), o alteran su estructura (monómeros de colágeno fibrilar), lo que conlleva a la migración de las CE y CML³⁴. Además de eso, la fibronectina, fibrina y otros componentes de la matriz suministran un mosaico de sustentación para el apoyo y las orientaciones de las CE.

Las integrinas son receptores de superficie celular específicos de la MEC que, por transmisión de informaciones bidireccionales entre el exterior y el interior de las células vasculares, ayudan a construir nuevos brotes vasculares de manera coordinada. Las integrinas $\alpha 5\beta 3$ y $\alpha 5\beta 5$ han venido siendo, desde hace ya mucho tiempo, consideradas un regulador positivo de la angiogénesis, porque sus antagonistas farmacológicos suprimen la angiogénesis patológica⁴³.

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (FCDP) - β y de su receptor FCDP-R β , desempeña un papel esencial en la estabilización de los vasos sanguíneos nacientes, reclutando células mesenquimales FCDP-R β positivo. La falta de reclutamiento de las CE tienen como resultado un crecimiento neovascular patológico, lo que provoca: la alteración de la permeabilidad neovascular, la fragilidad neovascular, el sangramiento, la insuficiencia de perfusión e hipoxia en embriones que les falta FCDP- β ⁴⁴. En vez de eso, una combinación de FCDP- β y VEGF resulta en la formación de brotes vasculares más maduros que una monoterapia con cualquier uno de los factores. Eso es muy importante para el futuro desarrollo de estrategias terapéuticas de la angiogénesis.

Otro sistema de señalización involucrado en el mantenimiento, crecimiento y estabilización del brote neovascular naciente, es el receptor TIE-2, que liga las angiopoietinas Ang-1 y Ang-2. A diferencia de la Ang-2, que activa la TIE-2 en algunas células,

pero bloquea el TIE-2 en otras, la Ang-1 activa consistentemente el receptor TIE-2. La Ang-1 a su vez, compacta los brotes neovasculares nacientes, a través de las moléculas de adhesión y genera una interacción entre las CE de las paredes como un adhesivo de proteínas y la contracción de pericitos. La actividad angiogénica de la Ang-2 está en la sinergia con el VEGF para estimular la angiogénesis en el corazón, pero cuando los signos no son suficientes, causa la muerte de las CE y la regresión del brote neovascular naciente. O sea, que los signos de activación TIE-2 deben funcionar como una báscula de precisión⁴⁵.

2. Fase intermedia: la estabilización del nuevo brote neovascular inmaduro.

El brote naciente neovascular se estabiliza a través del reclutamiento de las células murales y por la generación de una nueva MEC. Por lo menos cuatro vías moleculares están involucradas en la regulación de ese proceso: FCDP y su receptor β (FCDP-R β); esfingosina-1/fosfato-1 (S1P1); factor de diferenciación endotelial (receptor proteína esfingosina G-1 (EDG1); Ang1-TIE-2 y el FCT. El FCDP- β es segregado por la CE, tal vez como respuesta al VEGF. Aunque el FCDP- β esté expresado por las CE y las células murales, son éstas las responsables durante la fase de maduración de la angiogénesis. También son esenciales para la formación y la estabilización del brote neovascular, los receptores TIE-1 y TIE-2, y los dos ligadores para TIE-2, como Ang1 y Ang2. Las principales fuentes de Ang1 y Ang2 son respectivamente, las CE parietales y las CE de los órganos específicos. El Ang1 es conocida por la estabilización de los brotes vasculares emergentes y por hacerlos resistentes a la fuga entre las conexiones intercelulares. En la ausencia de VEGF, la Ang2 actúa como un antagonista de la Ang1 y desestabiliza el brote neovascular naciente, conllevando, finalmente, a su regresión. En presencia de VEGF, Ang2 facilita la angiogénesis. El FCT- $\beta 1$ es una citoquina multifuncional que genera el ciclo de maduración del brote neovascular en desarrollo por la estimulación de la MEC, al estimular la inducción y la diferenciación de las células mesenquimales en CE murales⁴⁶.

3. Fase final: maduración vascular de la angiogénesis fisiológica

Los determinantes moleculares de maduración neovascular pueden ser agrupados en tres categorías: I) Unión de los factores de crecimiento a un tipo de receptor celular, con su efecto correspondiente; II) Regulación molecular de las interacciones celulares; III) Regulación molecular de las interacciones entre las células endoteliales y la matriz extracelular.

I) Unión de los factores de crecimiento a un tipo de receptor celular, con su correspondiente efecto:

a) Receptores de CE flt1y, flk1 (VEGF-R1, VEGF-R2): 1) Regulación de las proteasas en la organización de la MEC; 2) Generación de la MEC provisional, que permite aumentar la permeabilidad; 3) Regulación del FCDP- β , que recluta las células para estabilizar la pared del vaso naciente; 4) Supresión de la apoptosis en los vasos nacientes; 5) Estabilización de las CE.

b) FCDP-R β ; Ang1/TIE-2: 1) Promoción de proliferación, migración y reclutamiento de las células murales; 2) Estabilización de vasos nacientes, lo que facilita las interacciones entre las uniones intercelulares (CE-CE, CE-MEC); 3) Supresión de la apoptosis de las CEC.

Actualización Clínica

c) Ang2/TIE1: induce a la apoptosis de las CE, en ausencia de VEGF.

d) Ang1/TIE1: coordinan la polaridad vascular.

e) FCT- β 1/FCT- β R11:

1) Promueven la producción de proteasas y MEC.

2) Promueven la diferenciación de fibroblastos para miofibroblastos.

f) FCT- β 1/ALK1 regulan la proliferación y la migración de CE.

g) FCT- β 1/ALK5: regulan la maduración de los nuevos vasos.

h) FCT- β 1/ALK1 y la endoglinina: promueven la especialización arterial y venosa.

II) Regulación molecular de las conexiones intercelulares:

a) V cadherina: forma las uniones entre las CE.

b) N-cadherina: conecta las células de la pared celular y las CE.

c) Conectinas: establece conexiones entre las CE y las CE y células parietales.

III) Regulación molecular de las interacciones entre las CE y la MEC:

a) α 5 β 1, α 1 β 1, α 2 β 1, α v β 3, α v β 5: supresión de la apoptosis de CE.

b) Proteasas: en su acción enzimática promueven la producción de la MEC, como por ejemplo, la segmentación del colágeno XVIII para endostatina, el plasminógeno, la angiotensina y proteasas como MMP2 y PEX.

c) Proteasas inhibitorias: evitan la degradación proteolítica de la MEC para estabilizar el vaso.

Esos datos sustentan de forma consistente, la hipótesis de que Ang2 y VEGF conllevan a la formación de los brotes neovasculares, mientras que Ang1 está involucrada en la estabilización del brote por interacción de las CE y de la célula mural⁴⁶.

3.1. Formación del lumen vascular

Durante el proceso de angiogénesis, ocurre la migración y la proliferación de CE por aproximadamente 24 horas, período durante el cual las proteasas tienen un papel crucial⁴⁶. La proliferación queda registrada al nivel de las CE y CML⁴⁷.

El proceso de formación del lumen vascular es una fase coordinada de adhesión molecular-celular durante la extensión del vaso sanguíneo. Las moléculas específicas responsables de la extensión del vaso no se conocen muy bien⁴⁸.

El receptor TIE-2 y de CE es necesario para el desarrollo de los vasos sanguíneos, como también para su mantenimiento y reparación. La Ang fue identificada como un ligador específico para el receptor TIE-2. Como ya se ha dicho, Ang-1 es un agonista de los receptores TIE-2 que promueve la supervivencia de las CE y reduce la permeabilidad vascular⁴⁹.

En contraposición con la Ang-1, la Ang-2 fue inicialmente descrita como un antagonista que bloquea la TIE-2/Ang-1 y que conduce a la activación del TIE-2, lo que resulta en la apoptosis de las CE. En el sistema de señalización de las CE para su supervivencia y migración, el TIE-2 es un componente esencial en el desarrollo de la vasculogénesis embrionaria,

como también de la angiogénesis en el adulto. Algunos trabajos recientes identificaron una proteína tirosina fosfatasa beta como una nueva CE-fosfatasa específica que regula la señalización Ang-1-TIE-2 de las CE. Así, algunas estrategias dirigidas para HPTP- β pueden ser beneficiosas para la señalización de la Ang1 y por tanto, mejoran la formación y la maduración de los neovasos en el contexto de la angiogénesis terapéutica. Además, podemos concluir diciendo que la hipoxia aumenta la expresión de HPTP- β y que reduce la fosforilación de la TIE-2, lo que nos da un nuevo horizonte sobre el papel potencial de la angiogénesis del HPTP- β . La inducción de HPTP- β por la hipoxia, puede representar un importante mecanismo regulador de activación del TIE-2 en la angiogénesis patológica⁵⁰.

Como colofón, podemos afirmar que las CE tienen un receptor tirosina-quinasa selectiva; el TIE-2 y sus ligadores, la angiopoietina Ang-1 y Ang-2, a su vez, son esenciales para el mantenimiento y la reparación de los vasos sanguíneos. La Ang-1 es un agonista de la activación de los receptores TIE-2. Sin embargo, la Ang-2 es contexto-dependiente, o sea, que puede ser antagonista o agonista. La proteína tirosina-fosfatasa beta (HPTP- β), desempeña un papel relevante en la supervivencia de las células endoteliales, modulando la señalización de Ang-1-TIE-2.

3.2. Permeabilidad neovascular

El VEGF conlleva a la proliferación y a la migración de las CE en el proceso de la angiogénesis. Fue inicialmente identificado como factor de permeabilidad vascular (VPF). Muchas evidencias sugieren que la angiogénesis viene precedida y/o seguida del aumento de la permeabilidad⁴.

Los mecanismos por los cuales VEGF/VPF aumentan la permeabilidad vascular (PV), continúan siendo desconocidos. Murohara et al⁵¹ identifican el óxido nítrico (ON) en la regulación de la PV, mientras que Van Der Zee et al⁵² identificaron, *in vitro*, que el VEGF/VPF estimula la producción de ON en el endotelio macrovascular.

Isner⁴ demostró la acción sinérgica entre ON y las prostaciclina producida por la interacción del VEGF/VPF con su receptor Flk-1/KDR/VEGF-R2 como mediador de la permeabilidad vascular inducida por VEGF/VPF, constituyendo una propiedad única del VEGF/VPF entre las citocinas angiogénicas. Cuando las proteasas fueron evaluadas por su capacidad de aumentar la permeabilidad por el test de Miles, el VEGF fue el único que aumentó la permeabilidad. Sin embargo, su mecanismo de acción no se conoce. El óxido nítrico ha sido usado como un factor regulador de la permeabilidad, dependiendo de su concentración local⁴.

Existen tres tipos diferentes de permeabilidad vascular:

1) permeabilidad de la membrana basal vascular (PBV), presente en los tejidos normales;

2) aumento de la permeabilidad vascular producido en respuesta a una única y a una breve exposición a la VEGF-A o a otros agentes;

3) aumento crónico de la permeabilidad vascular, que caracteriza la angiogénesis patológica.

Finalmente, observamos que el VEGF-A varía significativamente en diferentes cepas del ratón, y que es probable que la respuesta de la permeabilidad, tanto basal como inducida por algunos factores, también sea diferente en

ratones caseros con diferentes estructuras genéticas, aunque eso todavía no haya sido investigado de forma sistemática⁵³.

II. Respuestas de las Células Vasculares a la Hipoxia

La hipoxia conlleva al aumento de la señalización a través de la transcripción del FIH-1.

1. Células endoteliales

Existen dos mecanismos identificados en la hipoxemia que están ligados a la angiogénesis o a su bloqueo: uno, el que genera la proliferación y la supervivencia a través de CE por la activación de los receptores VEGF de señalización y expresión de eNOS, y otro, el que inicia la apoptosis. Los resultados pueden depender de la gravedad de la hipoxia. La hipoxemia moderada genera, principalmente, la proliferación y la supervivencia mientras que la hipoxemia grave, que se acerca a las condiciones anaeróbicas, puede causar una apoptosis significativa. *In vivo*, la acumulación de FIH proveniente de la apoptosis de CE no ha sido reportado⁶.

2. Células musculares lisas vasculares

Tal como ocurre con las células endoteliales, la hipoxemia grave provoca apoptosis de las CML, mientras que la hipoxemia moderada aumenta su proliferación. Inducida por la hipoxia, la expresión de la ciclo-oxigenasa (COX)-2 y FCDP- β es importante para los receptores de CML, que estimulan su proliferación. El mecanismo preciso no se conoce, pero una posibilidad es que el MT1-MMP actúe como una molécula accesoria de la actividad proteolítica asociada con el receptor FCDP- β ⁴⁵.

3. Macrófagos

En respuesta a la hipoxemia tisular, un gran número de monocitos es reclutado de la circulación hacia los tejidos hipóxicos, donde se diferencian en macrófagos. Varios factores y proteínas en los tejidos hipóxicos contribuyen para el reclutamiento de los monocitos, a saber: proteína-1 (MCP-1,

FNT- α , FEC-1, factor derivado del estroma (FDE)-1 y VEGF-A. Los macrófagos generan la angiogénesis al estimular la secreción de metaloproteinasas de la matriz (MMP), y una variedad de factores angiogénicos, tales como VEGF-A, FCF, interleucina-2 y factor de necrosis tumoral. Además, los macrófagos también segregan un corto péptido de 39 residuos de aminoácidos (PR39), que fácilmente pueden atravesar la membrana plasmática, entrar en las células e inhibir la degradación del FIH- α . Esa función del PR39 puede mejorar la capacidad de las células residentes de los tejidos hipóxicos de segregar factores angiogénicos, debido al aumento de la concentración local de FIH-1⁶.

Finalmente, también los macrófagos responden a la hipoxemia a través de la producción de una proteína reguladora de oxígeno (PRO), por el retículo endoplasmático, que genera la secreción de VEGF-A por el mismo retículo endoplasmático⁶.

Conclusión

De manera general, la angiogénesis coronaria en los adultos es fundamentalmente, una respuesta potente paracrina de la red capilar preexistente en condiciones fisiopatológicas de isquemia y/o de inflamación. La investigación básica y el entendimiento de los mecanismos son necesarios para darle fundamento a las grandes lagunas que tenemos en el conocimiento y posibilitar la ejecución de efectivas estrategias en el campo de la terapia angiogénica coronaria.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio no tuvo fuentes de financiación externas.

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de tesis de Doctorado de Gabriel Lorier, por IC/FUC.

Referencias

1. Kornowski R, Epstein SE, Leon MB. Handbook of myocardial revascularization and angiogenesis. London: Martin Dunitz Ltd; 1999.
2. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem. 1992;267(16):10931-4.
3. Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. Cardiovasc Res. 1999;43(4):835-7.
4. Isner JM. Angiogenesis. In: Topol EJ, ed. Textbook of cardiovascular medicine. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1998. p. 2491-518.
5. Gottschall C. Função cardíaca: da normalidade à insuficiência. São Paulo: BYK; 1995.
6. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nat Med. 2003;9(6):677-84.
7. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med. 2001;7(4):430-6.
8. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. Cell. 2006;124(1):175-89.
9. Vink A, Schoneveld AH, Lamers D, Houben AJ, van der Groep P, van Diest PJ, et al. HIF-1 alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages. Atherosclerosis. 2007;195(2):e69-75.
10. Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. Cardiovasc Res. 1994;28(8):1176-9.
11. Semenza GL. Transcriptional regulation by hypoxia-inducible factor 1 molecular mechanisms of oxygen homeostasis. Trends Cardiovasc Med. 1996;6(5):151-7.
12. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997;386(6626):671-4.
13. Henry TD. Can we really grow new blood vessels? Lancet. 1998;351(9119):1826-7.

14. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004;10(8):858-64.
15. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*. 2000;70(3):829-34.
16. Kleinman ME, Greives MR, Churgin SS, Blechman KM, Chang EI, Ceradini DJ, et al. Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(12):2664-70.
17. Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg*. 2005;80(1):229-36.
18. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107(9):1322-8.
19. Jo DY, Hwang JH, Kim JM, Yun HJ, Kim S. Human bone marrow endothelial cells elaborate non-stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1)-dependent chemoattraction and SDF-1-dependent transmigration of haematopoietic progenitors. *Br J Haematol*. 2003;121(4):649-52.
20. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004;110(21):3300-5.
21. Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, et al. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest*. 2000;80(1):99-115.
22. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003;107(8):1164-9.
23. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, et al. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood*. 2009;114(3):723-32.
24. Schmeisser A, Garlachs CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):671-80.
25. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*. 2004;94(2):230-8.
26. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(5):C947-70.
27. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.
28. Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(25):8966-71.
29. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438(7070):967-74.
30. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18(1):4-25.
31. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
32. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6(4):389-95.
33. Taipale J, Makinen T, Arighi E, Kukk E, Karkkainen M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:85-96.
34. Hangai M, Kitaya N, Xu J, Chan CK, Kim JJ, Werb Z, et al. Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am J Pathol*. 2002;161(4):1429-37.
35. Carmeliet P. Developmental biology: controlling the cellular brakes. *Nature*. 1999;401(6754):657-8.
36. Carmeliet P. Fibroblast growth factor-1 stimulates branching and survival of myocardial arteries: a goal for therapeutic angiogenesis? *Circ Res*. 2000;87(3):176-8.
37. Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):346-55.
38. Lutun A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep*. 2000;2(5):407-16.
39. Isner JM, Takayuki A. Therapeutic angiogenesis. *Front Biosci*. 1998;3:e49-69.
40. Werdich XQ, Penn JS. Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events. *Angiogenesis*. 2005;8(4):315-26.
41. Ozerdem U, Stallcup WB. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis*. 2003;6(3):241-9.
42. Tomanek RJ. Formation of the coronary vasculature during development. *Angiogenesis*. 2005;8(3):273-84.
43. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med*. 2002;8(9):918-21.
44. Montrucchio G, Alloati G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1669-99.
45. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3):835-70.
46. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9(6):685-93.
47. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Physiological assessment of augmented vascularity induced by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol*. 1994;267(4 Pt 2):H1263-71.
48. Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2260-8.
49. Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*. 1995;91(11):2687-92.
50. Yacyszyn OK, Lai PF, Forse K, Teichert-Kuliszewska K, Jurasz P, Stewart DJ. Tyrosine phosphatase beta regulates angiopoietin-Tie2 signaling in human endothelial cells. *Angiogenesis*. 2009;12(1):25-33.
51. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*. 1998;97(1):99-107.
52. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*. 1997;95(4):1030-7.
53. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11(2):109-19.