

Cicatrización de heridas: angiogénesis, linfangiogénesis y fibronectina

CELIA BORJA ALMARCHA, ROSA NOGUERA SALVÁ*

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA – FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA – UNIVERSIDAD DE VALENCIA;

FUNDACIÓN INVESTIGACIÓN CLÍNICO DE VALENCIA – INCLIVA

*Autora para correspondencia: rnoguera@uv.es

Recibido: 12 de abril de 2016 – Aceptado: 18 de abril de 2016

Resumen

Los diferentes componentes de la matriz extracelular (MEC) han sido estudiados durante mucho tiempo, pero no ha sido hasta las últimas décadas cuando se han empezado a elucidar sus diferentes implicaciones en el microambiente tisular para el correcto funcionamiento de los órganos. Una de estas funciones tiene relación con la organización del sistema circulatorio (tanto vascular como linfático). En la siguiente revisión, presentamos el papel decisivo que un componente de la MEC, la fibronectina, tiene en el desarrollo y función de la angiogénesis y linfangiogénesis. Ambos son procesos clave en la curación de heridas, y la fibronectina una de las glicoproteínas de la MEC fundamental para que se realicen correctamente. Mediante la revisión de los estudios realizados sobre la ausencia de esta glicoproteína o sus ligandos, las integrinas, destacamos su estrecha relación.

Palabras Clave: Cicatrización – Angiogénesis – Linfangiogénesis – Fibronectina – Integrina – Matriz Extracelular.

Abstract

Wound cicatrization: angiogenesis, lymphangiogenesis and fibronectin

The various components of the extracellular matrix (ECM) have been studied for decades, but only in recent years have we begun to realize its importance in correct tissue organization and function. Although we have not yet fully elucidated all the interactions involved in the ECM, there is no doubt it plays a principal role in the reorganization of the circulatory system (both vascular and lymphatic). Angiogenesis and lymphangiogenesis are key to wound healing. Fibronectin, an ECM glycoprotein, is essential to the correct development and function of these processes. Through a review of different studies carried out on the absence of this glycoprotein or its ligands, the integrins, we highlight its close relationship with wound healing.

Keywords: Wound Healing – Angiogenesis – Lymphangiogenesis – Fibronectin – Integrin – Extracellular Matrix.

UNA CORRECTA ANGIOGÉNESIS ES BÁSICA EN LA CURACIÓN DE LAS HERIDAS

Inmediatamente después de la aparición de una herida en la piel, diferentes mecanismos se ponen en marcha para su correcta cicatrización. Estos mecanismos se pueden dividir en tres fases, aunque éstas no siempre poseen unos límites claros¹. Los primeros esfuerzos se centran en mantener la homeostasis mediante la formación de una matriz extracelular (MEC) provisional y la contracción de los vasos sanguíneos próximos a la herida, formándose un coágulo principalmente formado por fibrina, fibronectina, vitronectina, trosspondina, eritrocitos y plaquetas². Las plaquetas colaboran activamente en la activación de macrófagos mediante la liberación de citoquinas². Las plaquetas liberan diferentes proteínas, entre las que se encuentran factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante beta 1, factor de crecimiento deri-

vado de plaquetas y factor de crecimiento endotelial vascular (TGF-Beta, PDGF y VEGF, respectivamente), muy importantes en etapas posteriores².

Posteriormente tiene lugar la fase de inflamación, en la que se movilizan neutrófilos y macrófagos para eliminar posibles microorganismos que hayan podido penetrar en la herida³. Estas células posteriormente serán reemplazadas por monocitos⁴. Tras la formación del coágulo, los vasos se dilatan y aumentan su permeabilidad para favorecer el aporte de nutrientes, factores de crecimiento y células. Este aumento de la permeabilidad se debe básicamente a la histamina. Además, se produce la citólisis de las células epidérmicas, liberando contenido al medio para actuar como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) activando así la inflamación local³. En la fase de proliferación, la acción más importante es restablecer la superficie de la herida, mediante la formación de tejido de granulación y la propia angiogénesis.

Los macrófagos presentes en la fase de inflamación estimulan la angiogénesis y la reconstrucción de la MEC mediante la liberación de diferentes factores. La falta de macrófagos funcionales se correlaciona con problemas en la formación de nueva epidermis, tejido granular y vascularización².

En la última fase, se producen cambios en los componentes formados en las anteriores fases, como la remodelación del colágeno tipo III a un colágeno de tipo I, mucho más resistente al estiramiento⁵. Una de las fases más críticas e importantes de la cicatrización es la angiogénesis, proceso que consiste en la migración, crecimiento y diferenciación de células endoteliales⁶. Al contrario de la vasculogénesis, en la que los vasos sanguíneos se forman de nuevo a partir de hemangioblastos derivados del mesoderma⁷, en la angiogénesis los nuevos vasos vasculares se forman a partir de los preexistentes.

El constante transporte de oxígeno, dióxido de carbono y metabolitos es fundamental, por lo tanto, la construcción de los vasos sanguíneos debe realizarse en cuanto antes.

En adultos, la angiogénesis está inducida principalmente por una hipoxia en el tejido⁸ y/o una hipoglucemia⁹. Ante esta situación, el tejido isquémico produce factores angiogénicos para poder activar la prolongación de vasos cercanos. Entre los numerosos factores angiogénicos producidos se encuentra el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), del que también se sabe que induce la linfangiogénesis. A pesar de promover la angiogénesis, un exceso de oxígeno también controla la eliminación de vasos sanguíneos sobrantes, ya que inhibe la expresión de VEGF⁹. La correlación entre la cantidad de oxígeno en el tejido y la expresión de VEGF se hace mediante HIF-1 (hipoxia-inducible factor-1). HIF-1 está formado por un heterodímero compuesto por HIF-1 α y HIF-1 β . En condiciones adecuadas de oxígeno, la HIF-1 α se ubiquitina y degrada. En cambio, cuando disminuye la presión de oxígeno, HIF-1 α se acumula y dimeriza con HIF-1 β ¹⁰, activando diferentes genes, entre los que se encuentra VEGF¹¹.

VEGF constituye una familia de factores de crecimiento capaces de estimular el crecimiento celular, proliferación y diferenciación¹². VEGF se utiliza para designar a diferentes proteínas (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario) y entre estas, VEGF-A es el principal factor en la regulación de la angiogénesis¹³. VEGF-A se presenta en los tejidos humanos de diferentes isoformas (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆), generadas por splicing alternativo de exones¹³. El mecanismo de actuación varía en las diferentes isoformas. Mientras que VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ (y la mayor parte de VEGF₁₆₅) están unidas a la superficie celular o a la MEC, VEGF₁₂₁ es difusible¹⁴. El hecho que esta isoforma sea difusible puede explicar cómo los vasos angiogénicos pueden llegar hasta el tejido isquémico. En el tejido con una falta de oxígeno debido a una pobre vascularización se sintetizaría VEGF₁₂₁, el cual difundiría en el espacio extracelular, uniéndose a las células endoteliales, que migrarían siguiendo un gradiente creciente de VEGF₁₂₁ hasta el tejido isquémico^{13, 15}. En cuanto a las moléculas más grandes, no

está claro su papel en la angiogénesis, ya que hay autores que consideran que son inactivas hasta que se fragmentan debido a la acción de proteasas¹³, mientras que otros consideran que tendrían una acción unidas a la MEC¹⁶.

VEGF-A se une a diferentes receptores, entre los que se incluyen VEGF1, VEGFR2 y VEGFR3, siendo VEGFR2 el principal receptor en células endoteliales. Estos receptores forman parte de la superfamilia de receptores tirosin-quinasas (RTK)¹⁷.

Durante el crecimiento de los vasos sanguíneos, las diferentes células que los componen tienen funciones específicas. Los vasos sanguíneos recién formados están constituidos principalmente por dos tipos celulares: células endoteliales y células murales (también conocidas como pericitos, células musculares lisas vasculares (vSMCs) o células de Rouget¹⁸. Estos dos tipos de células están rodeados por una membrana basal¹⁹. Recientemente se conoció la existencia de unas células endoteliales especiales localizadas en la parte más distal de los vasos sanguíneos, denominados "tip cells". Se cree que reaccionan por quimiostasis, creciendo de forma similar a los conos axónicos²⁰. Mientras que estas células dirigen el crecimiento del vaso, las células posteriores formarán el lumen del capilar²⁰. La unión de VEGF-A con su receptor, VEGFR2, produce la diferenciación, proliferación y ramificación de las células endoteliales²¹ mediante la activación de una compleja cascada iniciada por Notch²¹. La unión de VEGF-A a su receptor se produciría en las "tip cells", que se orientarían siguiendo una concentración creciente de VEGF-A²². La presencia de VEGF-A desencadenaría un aumento de la migración, proliferación y supervivencia de las células endoteliales, además de una organización 3D tubular²². En cuanto a las células murales, se cree que desempeñarían su función en las últimas etapas angiogénicas, sirviendo para estabilizar los vasos acabados de formar²³⁻²⁶.

LA LINFANGIOGÉNESIS TAMBIÉN OCURRE DURANTE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

Al igual que los vasos sanguíneos proliferan ante la curación de la herida, los vasos linfáticos también tienen que reestructurarse para garantizar el correcto funcionamiento vascular ya que de ellos depende la presión tisular, el correcto funcionamiento del sistema inmunológico entre otros factores²⁷.

Los vasos linfáticos poseen una gran similitud con los vasos sanguíneos, llegando a no mostrar diferencias en 97'5% de los genes analizados en un microarray de 12000 genes²⁸.

A pesar de esta similitud genética, los dos vasos se diferencian estructuralmente: la mayoría de los vasos linfáticos no poseen una membrana basal continua ni pericitos²⁹. Además, VEGF-A no parece tener una gran importancia en la linfangiogénesis, ya que el receptor principalmente encontrado en el sistema linfático, VEGFR-3, no se une a VEGF-A, pero sí a VEGF-C y VEGF-D²⁹. Mutaciones en VEGFR-3, incluso en heterocigosis, producen un desarrollo anormal de los vasos linfá-

ticos (linfedemas)³⁰, mientras que la ausencia de VEGF-C tiene como resultado la no formación de sistema linfático, ya que las células endoteliales a partir de las cuales se deberían formar los vasos linfáticos no presentan ramificación, produciendo la muerte prenatal por edemas³¹. VEGF-C inhibe la apoptosis de células linfáticas endoteliales que expresan VEGFR-3, mientras que en células que no expresan este receptor, la cantidad de VEGF-C necesaria para conseguir la inhibición de la apoptosis es de 5 a 10 veces superior³². La migración necesaria en las células endoteliales linfáticas también está mediada por VEGFR-3 en respuesta tanto a VEGF-D y en ocasiones también a VEGF-A³². VEGF-C se expresa durante el desarrollo embrionario fundamentalmente en las células mesenquimales cercanos a las venas a partir de las cuales se formarán los primeros vasos linfáticos, como son las regiones yugulares, axilares y perimetanefríticas, a parte del pulmón, corazón e hígado³³. VEGF-C puede estimular la angiogénesis en cornea mediante su unión a VEGFR-2, indicando que este factor de crecimiento promovería la angiogénesis en determinadas ocasiones³⁴. VEGFR-3 también está presente durante la angiogénesis en tumores³⁵ y en tejido granular asociado a heridas³⁶. Esta actuación de los diferentes factores de crecimiento tanto en vasos sanguíneos como en vasos linfáticos es una prueba del origen común de ambos sistemas.

Durante el 11.5 día embrionario, determinadas células endoteliales venosas yugulares se vuelven competentes y empiezan a expresar Prox-1 y esta expresión se considera el inicio de la linfangiogénesis, ya que estas células empiezan a ramificarse y separarse de la vena inicial³⁷, migrando hacia mayores concentraciones de VEGF-C³⁸. Prox1 es un factor de transcripción restringido a las células linfáticas endoteliales^{38, 39}. Se piensa que este factor de transcripción actúa mediante la integrina $\alpha 9$. Este factor es extremadamente importante en la migración de las células endoteliales linfáticas, ya que en ausencia de éste, las células endoteliales venosas dan lugar a las linfáticas, pero las células endoteliales linfáticas no migran, dando como resultado una ausencia del sistema linfático.³⁸ También participa en la expresión de integrinas específicas y receptores como el VEGFR3³⁸.

Finalmente los vasos linfáticos presentan poca abundancia en comparación con el sistema vascular sanguíneo de la integrina $\alpha 5$, que es reemplazada por las integrinas $\alpha 1$ y $\alpha 9$, que se unen a laminina, colágeno, osteopontina y tenascina²⁸, integrinas que no se detectan en el endotelio de los vasos sanguíneos⁴⁰.

LA FIBRONECTINA COMO ELEMENTO FUNDAMENTAL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

La MEC tiene un importante papel en diferentes procesos celulares, entre los que se encuentra la adhesión celular, migración, mantenimiento de la forma celular y proliferación⁴¹. Mediante las integrinas, situadas en la superficie celular, las células se unen a la MEC, permitiéndoles organizarse

en el espacio, responder a variaciones de su microambiente e incluso modificarlo⁴². La MEC está compuesta por una enorme variedad de proteínas: colágenos, proteoglicanos (formados por una proteína central unida a glucosaminoglicanos), glucosaminoglicanos libres (largas cadenas de heteropolisacáridos no ramificados) y glicoproteínas (proteínas con diferentes dominios unidos a glúcidos, tanto simples como compuestos). A parte de la fracción proteica, también encontramos una gran cantidad de agua, sobretodo retenida por los glucosaminoglicanos, iones y electrolitos. Los diferentes tipos de colágenos representan una gran parte de las proteínas totales. En los proteoglicanos destaca principalmente la presencia de agregano, mientras que el dermatan sulfato y el ácido hialurónico son los principales glucosaminoglicanos. Entre las glicoproteínas destaca la fibronectina, tanto por su abundancia como por su capacidad a unirse a gran cantidad de elementos.

Las glicoproteínas, proteínas con múltiples cadenas de azúcares unidas, sirven de nexo de unión entre los diferentes elementos de la MEC y las propias células. Las glicoproteínas importantes de la MEC son fibronectina, laminina, vitronectina o trombospondina, entre otras⁴². La unión entre las glicoproteínas y la célula se lleva a cabo por proteínas de la superficie, aunque las glicoproteínas también interactúan entre ellas y con otras proteínas de la MEC. Estos receptores de superficie son comúnmente las integrinas, aunque existen también otros elementos de la MEC que se unen a integrinas como distroglicanos⁴³ y sindecanos⁴⁴.

Una de las glicoproteína más abundante en los tejidos es la fibronectina. Está compuesta por tres dominios proteicos diferentes, que le permiten unirse a colágeno, otras fibronectinas, proteoglicanos y células de forma simultánea⁴⁵. Estos tres dominios se encuentran repetidos de forma desigual en cada cadena: hay 12 repeticiones del tipo I (FN1), 2 repeticiones del tipo II (FN2) y entre 15 y 17 repeticiones del tipo III (FN3). Está formada por un dímero de cadenas de 250 kDa similares unidas en el extremo C-terminal por puentes disulfuro⁴⁶. Existen diferentes tipos de fibronectina formadas gracias a splicing alternativo a partir de un mismo gen, con hasta 20 proteínas diferentes en humanos^{46, 47}. Además, pueden existir otros dos segmentos alternativos debido a "alternative exón usage": EDA (localizado entre el módulo 12º y 13º de la FN3) y EDB (entre el 7º y 8º de FN3). Por último, entre el módulo 14º y 15º de FN3 se encuentra una región variable, denominada V, de la que se encuentran 5 tipos diferentes en humanos (V0, V64, V89, V95 y V120)^{46, 48}. Todas estas combinaciones posibles resultan en una gran variedad de fibronectinas. La fibronectina celular se segrega principalmente en los fibroblastos y forma parte de la MEC insoluble⁴⁶.

A parte de conectar las células con la MEC, la fibronectina tiene un papel muy importante en el correcto desarrollo del sistema vascular sanguíneo, tanto en embriones (vasculogénesis) como en adultos (angiogénesis) y del sistema linfático. Esta importancia se ha puesto de manifiesto en diferentes experimentos en embriones de ratones con la mutación FN.null, los cuales presentan corazones defectuosos en los

casos menos severos pero pueden causar la no morfogénesis del miocardio y endocardio junto con la ausencia de vasos sanguíneos en el saco vitelino^{49, 50} o la no formación de la aorta dorsal⁵¹, provocando la letalidad del embrión durante la gastrulación en los casos más severos.

RELACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS Y LA LINFANGIOGÉNESIS CON LA FIBRONECTINA

Al contrario de lo que se creía inicialmente, la MEC no es un componente fijo del medio tisular que permanece estático y que sólo sirve de andamiaje para las células. Es bien conocido que ejerce una gran influencia sobre las células que rodea, incluidas las células de vasos sanguíneos y linfáticos^{39, 52-54}, como podemos observar en las figuras 1 y 2 adjuntas.

La relación entre la MEC y las células endoteliales no son las mismas en vasos quiescentes y vasos recién formados^{55, 56}. Una de las diferencias más evidentes se encuentra en la cantidad de fibronectina que rodea los vasos⁵⁵. En vasos recién creados, la cantidad de fibronectina es mucho mayor⁵⁵, apuntando a una importante relación entre la cantidad de fibronectina y el proceso de curación de heridas relacionados con la angiogénesis.

La unión entre las células y la fibronectina también es extremadamente importante y la falta de integrinas, especialmente $\alpha 5\beta 1$, produce en embriones los mismos efectos que la mutación FN.null^{55, 57, 58}. La unión entre fibronectina e integrina se realiza mediante una zona de la fibronectina conocida como secuencia RGD, localizada en el 10º módulo de FN3⁵². Una alteración en esta secuencia, como el cambio del último aminoácido por ácido glutámico produce un fenotipo parecido a los embriones que no presentan α -integrinas⁵³. Además de $\alpha 5\beta 1$, otras integrinas interactúan en la angio/linfangiogénesis, como $\alpha 5\beta 3$, cuyos niveles aumentan considerablemente al cultivar células endoteliales con VEGF-A⁵⁴. La neutralización de $\alpha 5\beta 3$ con anticuerpos (LM609) también causa una formación anormal de vasos sanguíneos, evitando la deposición de vitronectina, el ligando más importante de esta integrina.

Esta neutralización da como resultado la no formación de los lúmenes de los vasos sanguíneos, aortas fragmentadas con bordes irregulares y anastomosis anormales⁵⁹. La importancia de la integrina $\alpha 5\beta 3$ parece que reside en la subunidad $\alpha 5$, ya que los ratones con $\beta 3$ null son viables y fértiles⁵⁶, mientras que la mayoría de embriones $\alpha 5$ null mueren durante la gestación debido a deficiencias vasculares en la placenta o durante los primeros días de vida, por hemorragias gastrointestinales y/o intracerebrales⁵⁶, por lo que el fenotipo producido por la ausencia de esta subunidad puede estar más relacionado con su interacción con la fibronectina.

En cuanto al ligando principal de la fibronectina, la integrina $\alpha 5\beta 1$ ⁶⁰, las dos subunidades tienen importancia en cuanto a la formación de vasos sanguíneos y linfáticos, pero en diferentes estadios del desarrollo. Durante las primeras etapas, la importancia reside en la subunidad $\beta 1$ y su ausen-

cia es letal, incluso antes de la formación del sistema vascular debido a anomalías en la diferenciación de las células endoteliales^{61, 62}. Además, en teratomas que no expresan la subunidad $\beta 1$ se observa una deposición anormal y difusa de fibras de la MEC (fibronectinas y colágeno I principalmente)⁶² y un diámetro medio de vasos sanguíneos mucho más reducido⁶². Por otro lado, teratomas $\alpha 5$ -null presentan una distribución desorganizada de la MEC⁶³, aunque también presenta una vascularización reducida y retrasada⁶³.

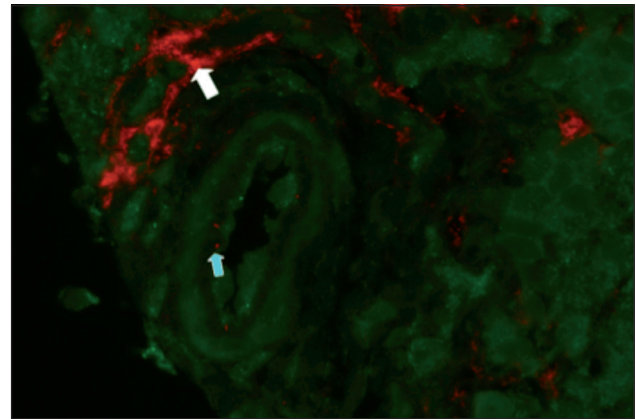


Imagen 1. Tinción inmunohistoquímica de Fibronectina en adventicia y nicho perivascular de un vaso sanguíneo (flecha). También se observa fibronectina en la minúscula lámina limitante interna (punta de flecha). La tinción fue realizada utilizando dos anticuerpos: anti-EDA (verde), que sólo reconoce la forma celular de la fibronectina y anti-FN (rojo), que reconoce tanto la forma plasmática como la celular.

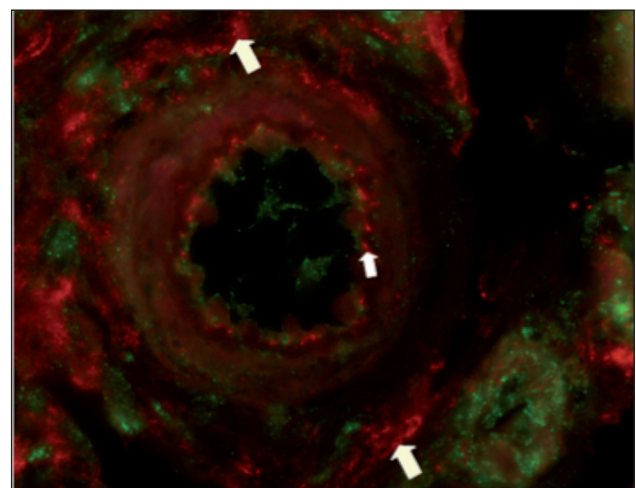


Imagen 2. Tinción inmunohistoquímica de Fibronectina la capa adventicia y nicho perivascular de un vaso sanguíneo (flechas) con lámina limitante interna bien desarrollada (punta de flecha). La tinción verde reconoce la forma celular de la fibronectina y la tinción roja muestra la forma plasmática y celular de la fibronectina.

Estas malformaciones en vasos sanguíneos pueden deberse a diferentes grados de actuación. Por ejemplo, se sabe que la fibronectina facilita la migración de las células endoteliales en presencia de VEGF-A, siendo la migración de las células cultivadas con VEGF y fibronectina 2.5 veces más rápida que las células cultivadas solo con VEGF⁶⁴. Este aumento de la migración se piensa que es debido a la presencia de fragmentos de fibronectina con actividad quimiotáctica para las células endoteliales⁶⁵. Además, la presencia de fibronectina produce un aumento de la vida activa de VEGF (desde 15 minutos sin fibronectina hasta 4 horas en presencia de fibronectina)⁶⁴.

A pesar de no cumplir funciones tan evidentes como la integrina $\alpha 5\beta 1$, se conocen otras integrinas implicadas en el crecimiento celular y/o la migración durante la angiogénesis, como $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 8$ ⁶⁶, de las cuales se sabe que una gran cantidad se unen a fibronectina ($\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$)^{67,68}.

Alteraciones en la propia fibronectina son extremadamente perjudiciales para el embrión. Los avances en las funciones de la fibronectina relacionadas con la angiogénesis se basan principalmente en los fenotipos producidos por genes de fibronectina mutantes (tanto en animales completos, como *Xenopus* o ratón, como en cultivo). La importancia de la fibronectina es tal que la delección de determinadas partes de su estructura (EIIA o EIIB) también producen fenotipos letales, debido a malformaciones en la vascularización de la placenta y en la formación del corazón⁶⁹.

Además de su importancia en las interacciones célula-MEC, la fibronectina también parece tener un papel relevante en las uniones célula-célula. El estudio de los defectos en la vasculatura producidos por la modificación de ZO-1 (una de las proteínas que conforman la zona ocludens, proteínas que guían la deposición de claudinas en las uniones estrechas) son extremadamente parecidos al fenotipo causado por FN-null⁷⁰, posibilitando la existencia de una relación entre la fibronectina y la localización de ZO-1 en las uniones entre células endoteliales^{70,71}.

Al igual que en la angiogénesis, las integrinas también son muy importantes en la linfangiogénesis. Una de las integrinas más importantes en la formación del sistema linfático es $\alpha 9\beta 1$, entre cuyos ligandos se encuentra osteopontina, tenascina y fibronectina⁷². Una ausencia en la subunidad $\alpha 9$ de esta integrina produce una acumulación de líquido linfático en el tórax (quilotórax) que causa la muerte entre los 6 y 12 días en ratones $\alpha 9^{-/-}$ ⁷² y una mutación en el gen codificante de la subunidad $\alpha 9$ puede ser la causa de quilotórax también en humanos⁷³. El correcto desarrollo del sistema linfático está basado en esta integrina, cuya síntesis está regulada por Prox-1³⁸, que participa en la correcta migración de las células linfáticas hacia VEGF-C en vez de VEGF-A mediante la expresión de $\alpha 9\beta 1$. Pero el sistema linfático no es totalmente inactivo a VEGF-A, ya que este factor de crecimiento actúa en la curación de heridas mediante la expresión de las integrinas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, gracias a su unión con VEGFR-2 en vasos linfáticos⁷⁴. Está interrelación

entre los factores de crecimiento y los receptores tanto en el sistema vascular sanguíneo como en el linfático da una idea de paridad en la construcción de los dos sistemas circulatorios. La integrina principal en la angiogénesis, $\alpha 5\beta 1$, también ejerce funciones en la linfangiogénesis, aunque de forma más restringida⁷⁵.

A parte de las integrinas, la propia MEC también tiene un papel importante en linfangiogénesis. Esta importancia se pone de manifiesto al cultivar células endoteliales linfáticas, ya que los cultivos con fibronectina presentan una mayor adhesión y proliferación^{32,76}. Este aumento de la supervivencia y proliferación se debe a una interacción con el receptor VEGFR-3, ya que una mutación en VEGF-C (que en principio ejerce como ligando de VEGFR-2 y VEGFR-3) que le incapacita para unirse a VEGFR-2 no provoca cambios en la morfología vascular⁷⁶. Además, la incubación de células endoteliales linfáticas con otros elementos de la MEC, como vitronectina, no produce el mismo grado de supervivencia ni de proliferación⁷⁶. Esta mejora del cultivo en presencia de fibronectina se sospecha que está mediado por su principal ligando, la integrina $\alpha 5\beta 1$, concretamente la subunidad $\beta 1$ ⁷⁶. $\beta 1$ se asociaría con VEGFR-3 al ser estimulada por la MEC, en concreto por fibronectina, pero también por el colágeno, provocando un incremento en la fosforilación de la tirosina de VEGFR-3⁷⁷. El hecho de que tanto colágeno como fibronectina provoquen esta fosforilación puede ser debido a que las dos fibras se unen a las células mediante integrinas que contienen la subunidad $\beta 1$ ($\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ para colágeno y $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ para fibronectina). La migración de las células endoteliales linfáticas hacia gradientes superiores de VEGF-D solo se produciría en presencia de colágeno en células que expresen la integrina $\beta 1$ ⁷⁷, sugiriendo que lo mismo ocurriría si fuese la fibronectina la que se añadiese al medio y actuara mediante $\beta 1$.

La inhibición de la apoptosis por parte de la integrina $\alpha 5\beta 1$ ha sido más estudiada en angiogénesis, aunque debido a la presencia de ésta en los vasos linfáticos, se piensa que podría existir un mecanismo molecular similar⁷⁸. Antagonistas de esta integrina activaría la protein quinasa A, llevando a la activación de la caspasa-8 y una posterior inducción de la apoptosis⁷⁸. Además, la unión de esta integrina con la MEC es fundamental para la supervivencia celular^{32,77,79}. La unión de la fibronectina a la integrina $\alpha 5\beta 1$ también desencadenaría la supervivencia celular mediante la inducción de PI3 quinasa (cascada de fosfatidilinositol 3'-OH quinasa/ c-Akt quinasa), conocida como promotora de la supervivencia celular⁸⁰.

Por último, también existen ejemplos sobre el papel desarrollado por la fibronectina a la hora de formar el sistema linfático a un nivel macrocelular. El exón alternativo A de la fibronectina (EDA) promueve la tubulogénesis de las células endoteliales linfáticas al unirse a la integrina $\alpha 5\beta 1$ y esta tubulogénesis desciende considerablemente cuando un inhibidor de EDA, como la endostatina, está presente en el medio⁸¹. Además de la formación tubular, las válvulas linfáticas que dirigen el movimiento de la linfa en un solo sentido también están relacionadas con la fibronectina. En estas vál-

vulas abunda la expresión de Notch1, que a su vez regula la expresión de la integrina $\alpha 9$ y de la fibronectina E11A, entre otros genes⁸². La ausencia de la FN-E11A produce una malformación y escasez de válvulas linfáticas, fenotipo que también observamos en los embriones $\alpha 9$ -null, pero no en embriones deficientes en otros ligandos de la integrina $\alpha 9$, como la osteopontina o tenascina⁴⁰.

CONCLUSIÓN

Después de analizar los problemas asociados a un incorrecto funcionamiento del sistema vascular y/o linfático debido a mutaciones en la fibronectina, podemos establecer una relación de extrema dependencia entre este componente de la MEC y los sistemas de transporte sanguíneo y linfático de los vertebrados. Esta dependencia, aunque ha sido mayoritariamente estudiada en embriones durante los primeros estadios, también se observa en la curación de heridas, donde se tienen que remodelar tanto los vasos sanguíneos como linfáticos para proveer de vascularización los tejidos isquémicos. Por tanto, el estudio de los mecanismos moleculares que rigen la proliferación de las células endoteliales vasculares y linfáticas es de vital importancia a la hora de encontrar nuevas dianas terapéuticas tanto para la cicatrización de heridas

crónicas como úlceras vasculares como para patologías vasculares.

A parte del papel indiscutible de la fibronectina en la curación de heridas, la fibronectina está adquiriendo una creciente importancia en el diagnóstico y prognosis de otras dolencias, como puede ser el cáncer. En un estudio preliminar realizado por este laboratorio sobre la relación de la MEC con tumores neuroblásticos, se estableció una relación significativa entre la cantidad de fibronectina con el módulo EDA y un peor pronóstico en pacientes mayores de 18 meses⁸³ mediante cuantificación por inmunofluorescencia indirecta (IFI)⁸⁴.

El hecho de que los tumores malignos interfieran en la remodelación de estos dos sistemas de transporte para su diseminación y metástasis hacen más urgente aún si cabe el conocimiento en profundidad del papel de la fibronectina en la creación y remodelación de los vasos sanguíneos y linfáticos.

AGRADECIMIENTOS

A la Red Temática de Investigación Contra el Cáncer RTICC (RD12/0036/0020), Fondo de Investigación Sanitaria, FIS (PI14/01008) y Fundación Asociación Española Contra el Cáncer, FAECC. ●

Bibliografía

- [1] REINKE JM, SORG H (2012). Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 49: 35-43.
- [2] MAHDAVIAN DELAVARY B, VAN DER VEER WM, VAN EGMOND M, NIESSEN FB, BEELEN RH (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology* 216: 753-762.
- [3] KASUYA A, TOKURA Y (2014). Attempts to accelerate wound healing. *J Dermatol Sci* 76: 169-172.
- [4] KOH TJ, DIPIETRO LA (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med* 13: e23.
- [5] MARCOS GARCÉS V, RSA (2014). Cambios en la cicatrización de heridas durante el envejecimiento cutáneo. *Heridas y Cicatrización* 17: 8-16.
- [6] D'ALESSIO A, MOCCIA F, LI JH, MICERA A, KYRIAKIDES TR (2015). Angiogenesis and Vasculogenesis in Health and Disease. *Biomed Res Int* 2015: 126582.
- [7] PATAN S (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 50: 1-15.
- [8] DETMAR M, BROWN LF, BERSE B, JACKMAN RW, ELICKER BM, DVORAK HF ET AL (1997). Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol* 108: 263-268.
- [9] DOR Y, PORAT R, KESHET E (2001). Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1367-1374.
- [10] CUMMINS EP, TAYLOR CT (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 450: 363-371.
- [11] Bosch-Marce M, Okuyama H, Wesley JB, Sarkar K, Kimura H, Liu YV et al (2007). Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia. *Circ Res* 101: 1310-1318.
- [12] SHIM JW, SANDLUND J, MADSEN JR (2014). VEGF: a potential target for hydrocephalus. *Cell and tissue research* 358: 667-683.
- [13] FERRARA N (2010). Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action. *Mol Biol Cell* 21: 687-690.

Revisión

Cicatrización de heridas: angiogénesis, linfangiogénesis y fibronectina

- [14] HOUCK KA, LEUNG DW, ROWLAND AM, WINER J, FERRARA N (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 267: 26031-26037.
- [15] KEYT BA, BERLEAU LT, NGUYEN HV, CHEN H, HEINSOHN H, VANDLEN R ET AL (1996). The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *The Journal of biological chemistry* 271: 7788-7795.
- [16] PARK JE, KELLER GA, FERRARA N (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4: 1317-1326.
- [17] KARAMYSHEVA AF (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73: 751-762.
- [18] HIRSCHI KK, D'AMORE PA (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32: 687-698.
- [19] EICHMANN A, PARDANAUD L (2014). Emergence of Endothelial Cells during Vascular Development In: Feige J-J, Pagès G, Soncin F (eds). *Molecular Mechanisms of Angiogenesis*. Springer. pp 3-23.
- [20] EICHMANN A, THOMAS JL (2013). Molecular parallels between neural and vascular development. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3: a006551.
- [21] ADAMS RH, ALITALO K (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 464-478.
- [22] GERHARDT H, GOLDING M, FRUTTIGER M, RUHRBERG C, LUNDKVIST A, ABRAMSSON A ET AL (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161: 1163-1177.
- [23] TAHERGORABI Z, KHAZAEI M (2012). A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci* 15: 1110-1126.
- [24] JAIN RK (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693.
- [25] BENJAMIN LE, GOLI JANIN D, ITIN A, PODE D, KESHET E (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of clinical investigation* 103: 159-165.
- [26] CARMELIET P (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-936.
- [27] CUENI LN, DETMAR M (2008). The lymphatic system in health and disease. *Lymphat Res Biol* 6: 109-122.
- [28] PETROVA TV, MAKINEN T, MAKELA TP, SAARELA J, VIRTANEN I, FERRELL RE ET AL (2002). Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *The EMBO journal* 21: 4593-4599.
- [29] CUENI LN, DETMAR M (2006). New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* 126: 2167-2177.
- [30] KARKKAINEN MJ, SAARISTO A, JUSSILA L, KARILA KA, LAWRENCE EC, PAJUSOLA K ET AL (2001). A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 12677-12682.
- [31] KARKKAINEN MJ, HAIKO P, SAINIO K, PARTANEN J, TAIPALE J, PETROVA TV ET AL (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5: 74-80.
- [32] MAKINEN T, VEIKKOLA T, MUSTJOKI S, KARPANEN T, CATIMEL B, NICE EC ET AL (2001). Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *The EMBO journal* 20: 4762-4773.
- [33] KUKK E, LYMBOUSSAKI A, TAIRA S, KAIPAINEN A, JELTSCH M, JOUKOV V ET AL (1996). VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 122: 3829-3837.
- [34] CAO Y, LINDEN P, FARNEBO J, CAO R, ERIKSSON A, KUMAR V ET AL (1998). Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14389-14394.
- [35] VALTOLA R, SALVEN P, HEIKKILA P, TAIPALE J, JOENSUU H, REHN M ET AL (1999). VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *The American journal of pathology* 154: 1381-1390.
- [36] PARTANEN TA, AROLA J, SAARISTO A, JUSSILA L, ORA A, MIETTINEN M ET AL (2000). VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 14: 2087-2096.
- [37] OLIVER G, DETMAR M (2002). The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes & development* 16: 773-783.
- [38] MISHIMA K, WATABE T, SAITO A, YOSHIMATSU Y, IMAIZUMI N, MASUI S ET AL (2007). Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin alpha9 and other signaling cascades. *Mol Biol Cell* 18: 1421-1429.
- [39] WIIGH, KESKIND, KALLURIR (2010). Interaction between the extracellular matrix and lymphatics: consequences for lymphangiogenesis and lymphatic function. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 29: 645-656.

- [40] BAZIGOU E, XIE S, CHEN C, WESTON A, MIURA N, SOROKIN L ET AL (2009). Integrin- α 9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis. *Dev Cell* 17: 175-186.
- [41] STERNLICHT MD, WEBB Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516.
- [42] XU J, MOSHER D (2011). Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins In: Mecham RP (ed). *The extracellular matrix: an overview*. Springer. pp 41-75.
- [43] POZZI A, ZENT R (2011). Extracellular matrix receptors in branched organs. *Current opinion in cell biology* 23: 547-553.
- [44] JACQUEMET G, HUMPHRIES MJ, CASWELL PT (2013). Role of adhesion receptor trafficking in 3D cell migration. *Current opinion in cell biology* 25: 627-632.
- [45] SCHWARZBAUER JE, DESIMONE DW (2011). Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- [46] ROMBERGER DJ (1997). Fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 939-943.
- [47] FFRENCH-CONSTANT C (1995). Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res* 221: 261-271.
- [48] FFRENCH-CONSTANT C, HYNES RO (1989). Alternative splicing of fibronectin is temporally and spatially regulated in the chicken embryo. *Development* 106: 375-388.
- [49] GEORGE EL, BALDWIN HS, HYNES RO (1997). Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood* 90: 3073-3081.
- [50] GEORGE EL, GEORGES-LABOUESSE EN, PATEL-KING RS, RAYBURN H, HYNES RO (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119: 1079-1091.
- [51] ARGRAVES WS, DRAKE CJ (2005). Genes critical to vasculogenesis as defined by systematic analysis of vascular defects in knockout mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 286: 875-884.
- [52] AZIZ-SEIBLE RS, CASEY CA (2011). Fibronectin: functional character and role in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 17: 2482-2499.
- [53] TAKAHASHI S, LEISS M, MOSER M, OHASHI T, KITAO T, HECKMANN D ET AL (2007). The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly. *J Cell Biol* 178: 167-178.
- [54] SENGER DR, LEDBETTER SR, CLAFFEY KP, PAPAODOPOULOS-SERGIU A, PERUZZI CA, DETMAR M (1996). Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *The American journal of pathology* 149: 293-305.
- [55] HYNES RO (2007). Cell-matrix adhesion in vascular development. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1: 32-40.
- [56] IIVANAINEN E, KAHARI VM, HEINO J, ELENIUS K (2003). Endothelial cell-matrix interactions. *Microsc Res Tech* 60: 13-22.
- [57] GEORGES-LABOUESSE EN, GEORGE EL, RAYBURN H, HYNES RO (1996). Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 207: 145-156.
- [58] YANG JT, RAYBURN H, HYNES RO (1993). Embryonic mesodermal defects in α 5 integrin-deficient mice. *Development* 119: 1093-1105.
- [59] DRAKE CJ, CHERESH DA, LITTLE CD (1995). An antagonist of integrin α v β 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *Journal of cell science* 108 (Pt 7): 2655-2661.
- [60] PYTELA R, PIERSCHBACHER MD, RUOSLAHTI E (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 40: 191-198.
- [61] STEPHENS LE, SUTHERLAND AE, KLIMANSKAYA IV, ANDRIEUX A, MENESES J, PEDERSEN RA ET AL (1995). Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes & development* 9: 1883-1895.
- [62] BLOCH W, FORSBERG E, LENTINI S, BRAKEBUSCH C, MARTIN K, KRELL HW ET AL (1997). Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol* 139: 265-278.
- [63] TAVERNA D, HYNES RO (2001). Reduced blood vessel formation and tumor growth in α 5-integrin-negative teratocarcinomas and embryoid bodies. *Cancer research* 61: 5255-5261.
- [64] WIJELATH ES, MURRAY J, RAHMAN S, PATEL Y, ISHIDA A, STRAND K ET AL (2002). Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. *Circ Res* 91: 25-31.
- [65] GRANT MB, CABALLERO S, BUSH DM, SPOERRI PE (1998). Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration. *Diabetes* 47: 1335-1340.

Revisión

Cicatrización de heridas: angiogénesis, linfangiogénesis y fibronectina

- [66] AVRAAMIDES CJ, GARMY-SUSINI B, VARNER JA (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Cancer* 8: 604-617.
- [67] PLOW EF, HAAS TA, ZHANG L, LOFTUS J, SMITH JW (2000). Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry* 275: 21785-21788.
- [68] KOMORIYA A, GREEN LJ, MERVIC M, YAMADA SS, YAMADA KM, HUMPHRIES MJ (1991). The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *The Journal of biological chemistry* 266: 15075-15079.
- [69] ASTROF S, CROWLEY D, HYNES RO (2007). Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Dev Biol* 311: 11-24.
- [70] KATSUNO T, UMEDA K, MATSUI T, HATA M, TAMURA A, ITOH M ET AL (2008). Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell* 19: 2465-2475.
- [71] ASTROF S, HYNES RO (2009). Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12: 165-175.
- [72] HUANG XZ, WU JF, FERRANDO R, LEE JH, WANG YL, FARESE RV, JR. ET AL (2000). Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha9beta1. *Mol Cell Biol* 20: 5208-5215.
- [73] MA GC, LIU CS, CHANG SP, YEY KT, KE YY, CHEN TH ET AL (2008). A recurrent ITGA9 missense mutation in human fetuses with severe chylothorax: possible correlation with poor response to fetal therapy. *Prenat Diagn* 28: 1057-1063.
- [74] HONG YK, LANGE-ASSCHENFELDT B, VELASCO P, HIRAKAWA S, KUNSTFELD R, BROWN LF ET AL (2004). VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *FASEB J* 18: 1111-1113.
- [75] DIETRICH T, ONDERKA J, BOCK F, KRUSE FE, VOSSMEYER D, STRAGIES R ET AL (2007). Inhibition of inflammatory lymphangiogenesis by integrin alpha5 blockade. *The American journal of pathology* 171: 361-372.
- [76] ZHANG X, GROOPMAN JE, WANG JF (2005). Extracellular matrix regulates endothelial functions through interaction of VEGFR-3 and integrin alpha5beta1. *J Cell Physiol* 202: 205-214.
- [77] WANG JF, ZHANG XF, GROOPMAN JE (2001). Stimulation of beta 1 integrin induces tyrosine phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and modulates cell migration. *The Journal of biological chemistry* 276: 41950-41957.
- [78] KIM S, BAKRE M, YIN H, VARNER JA (2002). Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. *The Journal of clinical investigation* 110: 933-941.
- [79] O'BRIEN V, FRISCH SM, JULIANO RL (1996). Expression of the integrin alpha 5 subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation. *Exp Cell Res* 224: 208-213.
- [80] DATTA SR, BRUNET A, GREENBERG ME (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes & development* 13: 2905-2927.
- [81] OU J, LI J, PAN F, XIE G, ZHOU Q, HUANG H ET AL (2011). Endostatin suppresses colorectal tumor-induced lymphangiogenesis by inhibiting expression of fibronectin extra domain A and integrin alpha9. *Journal of cellular biochemistry* 112: 2106-2114.
- [82] MURTOMAKI A, UH MK, KITAJEWSKI C, ZHAO J, NAGASAKI T, SHAWBER CJ ET AL (2014). Notch signaling functions in lymphatic valve formation. *Development* 141: 2446-2451.
- [83] Quantification of fibronectin. A preliminary study in neuroblastoma XVIII Congress SEHIT (Spanish Society of Histology and Tissular engineering); Bilbao, Spain (16-18 September, 2015).
- [84] BURGOS-PANADERO R, CERVERA IT, BLANQUER-MACEIRAS M, ROSSELLÓ MC, SALVÁ RN (2015). Fibronectina: Estructura y Función. *Análisis cuantitativo con imagen microscópica Heridas y Cicatrización* 20: 6-11.

Conflicto de intereses: Los autores confirman no tener ningún conflicto de interés