

A VIA DE SINALIZAÇÃO DO TGF- β NA BIOLOGIA VASCULAR

Angelo Calado

Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa
Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa

SUMÁRIO

A via de sinalização do TGF- β é vital para a regulação de processos celulares, como a proliferação e a diferenciação, em vários tecidos de eucariotas superiores. Em particular, este sistema de transdução de sinal desempenha um importante papel no desenvolvimento e homeostasia do tecido vascular. Entre outros dados, este conceito é ilustrado pelo facto de que: 1) estudos recentes com ratinhos *knockout* demonstrarem que determinados componentes desta via de sinalização são essenciais para o sistema vascular e 2) mutações em componentes da via de sinalização do TGF- β poderem conduzir a doenças vasculares entre outras patologias.

Palavras-chave: Transdução de sinal; Citocina, Factor de crescimento e transformação-beta (TGF- β); Receptor de cinase serina/treonina; Smad; Biologia Vascular; Endotélio; Células endoteliais; Músculo vascular liso; Vasculogénese; Angiogénese; Telangiectásia hemorrágica hereditária; Hipertensão pulmonar primária.

ABSTRACT

The TGF- β signalling pathway is pivotal for the regulation of essential cellular processes, such as proliferation and differentiation, in various tissues of higher eukaryotes. Particularly, this signal transduction pathway plays an important role in the development and homeostasis of the vascular tissue. Among other data, this concept is well documented by the fact that: 1) recent studies with knockout mice demonstrate that certain components of this signalling pathway are essential for the vascular system and 2) mutations in components of the TGF- β signalling pathway can lead to vascular diseases among other pathologies.

INTRODUÇÃO

Os eucariotas possuem sistemas de sinalização que permitem regular vários processos celulares vitais para o organismo. Um dos mais importantes desses sistemas constitui a via de transdução de sinal do factor de crescimento e transformação beta, TGF- β (abreviatura do inglês, *Transforming Growth Factor- β*). Esta via desempenha um papel fulcral durante o desenvolvimento embrionário e no estado adulto, em processos como a proliferação celular, a diferenciação celular, a morte celular programada, a migração celular e a produção de matriz extra-celular (6,13,20). O presente artigo

pretende inicialmente dar uma perspectiva do conhecimento actual sobre esta via de sinalização, esquematizada na Fig. 1, e posteriormente, abordar a sua importância na elaboração e manutenção do sistema vascular e analisar as manifestações patológicas vasculares causadas por defeitos nesta via.

Via de transdução de sinal do TGF- β

A via de sinalização do TGF- β permite integrar sinais extracelulares e traduzi-los na activação da transcrição de determinados genes e assim na elaboração de determinada resposta celu-

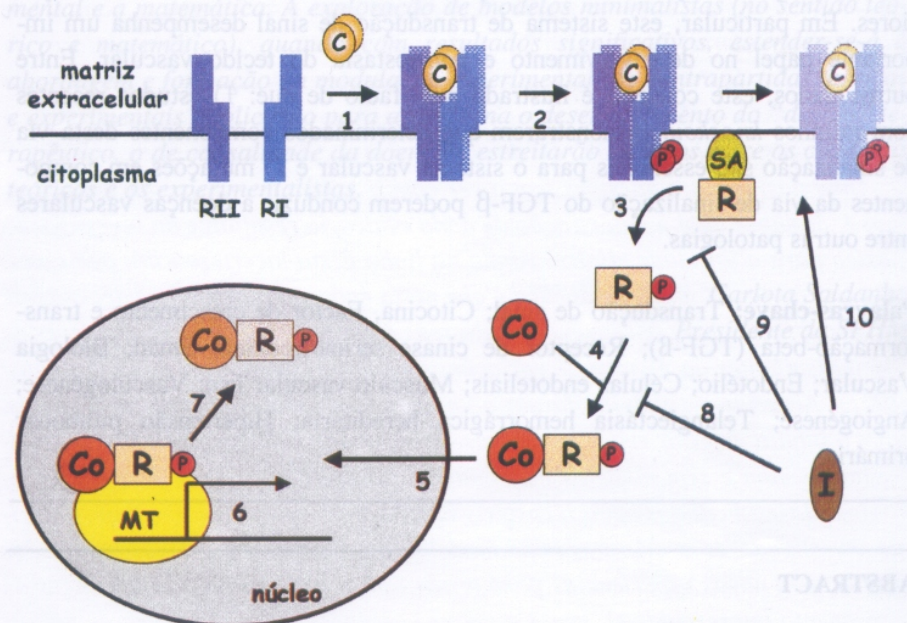


Fig. 1 - Via de transdução de sinal do TGF- β .

Esta via de sinalização envolve as seguintes etapas: (1) montagem do complexo entre os receptores de cinase serina/treonina e a citocina (representada por C); (2) fosforilação do receptor tipo I (representado por RI) pelo receptor tipo II (representado por RII); (3) activação por fosforilação da R-Smad (representada por R); (4) formação do complexo entre a R-Smad e a Co-Smad (representada por Co); (5) importação do complexo Smad para o núcleo; (6) activação da transcrição genética; (7) degradação proteolítica do complexo de Smad; (8) inibição da formação do complexo Smad pela I-Smad (representada por I) proveniente do núcleo ou neo-sintetizada em resultado da activação da via de sinalização do TGF- β ; (9) inibição do complexo receptor-citocina pela I-Smad e (10) degradação proteolítica do complexo de receptores mediada pela I-Smad.

MT - maquinaria de transcrição; SA - sítio de ancoragem

lar (11,12). Esses sinais extracelulares são comunicados às células, ao nível da membrana plasmática, sob a forma de citocinas da superfamília do factor TGF- β , proteínas diméricas, estrutural e funcionalmente relacionadas com a proteína TGF- β . Esta superfamília inclui proteínas como os TGF- β , as ativinas e as proteínas morfogenéticas do osso, ou BMP (abreviatura do inglês, *Bone Morphogenetic Proteins*).

Estas citocinas promovem a montagem de complexos de receptores específicos ao nível da membrana plasmática (11). Estes complexos são constituídos por dois monómeros de cada uma das classes de receptores transmembranares de cinase de serina/treonina: os tipo II e os tipo I. Em certos casos, outras proteínas acessórias podem ainda auxiliar neste processo de montagem, como o beta-glicano ou a endogлина. Após formação do complexo receptor-citocina, os receptores de tipo II activam por fosforilação os receptores de tipo I, que por sua vez propagam o sinal para as proteínas Smad. A designação Smad tem origem nos membros fundadores desta família de proteínas, a proteína Sma do nemátodo, *Caenorhabditis elegans*, e a proteína MAD da mosca do vinagre, *Drosophila melanogaster* (5). Estas proteínas agrupam-se em três classes funcionais: 1) as R-Smad, Smad reguladas por receptores (Smad1, 2, 3, 5 e 8); as Co-Smad, Smad de parceiro comum (das quais a Smad4 é única representante em humanos) e por último as I-Smad, Smad inibidoras (Smad6 e 7) (10,15, 16,20).

No estado basal, as R-Smad são retidas no citoplasma por interacção com proteínas, como a proteína de ancoragem de Smad para activação de receptor, SARA (abreviatura do inglês, *Smad anchor for receptor activation*). Por se encontrar ancorada na membrana plasmática e interagir com os com-

plexos de receptores, a proteína SARA facilita o acesso do complexo receptor-citocina às R-Smad e possibilita a sua fosforilação mediada pelos receptores do tipo I (20). A activação das R-Smad promove a sua libertação dos sítios de ancoragem, possibilitando a sua interacção com as Co-Smad no citoplasma e subsequente importação para o núcleo do complexo heteromérico de Smad assim constituído. Neste compartimento celular, os complexos de Smad funcionam como moduladores de transcrição (1). Dada a sua capacidade de ligação ao DNA e ao interagirem com diferentes factores, co-activadores ou co-repressores de transcrição e outros factores de ligação ao DNA, estes complexos podem regular a transcrição genética.

Por forma a limitar-se a duração ou intensidade do sinal transmitido, esta via de sinalização pode ser silenciada pela acção das I-Smad ou por degradação proteolítica dos complexos Smad (20). As Smad inibidoras podem inibir a actividade ou promover a degradação proteolítica dos complexos de receptores, ou ainda no caso específico da Smad6, competir com as R-Smad para a ligação com a Smad4. No estado basal, enquanto a Smad6 se difunde entre o núcleo e o citoplasma, a Smad7 encontra-se predominantemente no núcleo, sendo exportada para o citoplasma após activação da via de sinalização (15). Por outro lado, a expressão das I-Smad pode ser induzida pela própria via de sinalização do TGF- β , num processo de *feed-back* negativo (20).

Conforme referido anteriormente, esta via de sinalização permite assegurar respostas celulares diversas. A especificidade dessas respostas é determinada em vários passos do processo de transdução de sinal. Em primeiro lugar, diferentes citocinas

podem sinalizar por via de diferentes receptores e proteínas Smad, e a mesma citocina pode utilizar diferentes componentes em contextos celulares diferentes (16). Desta forma, diferentes estímulos poderão ser diferentemente processados originando respostas celulares diferentes. Por outro lado, a especificidade da resposta depende igualmente da maquinaria de transcrição existente num determinado tipo celular e em determinado estágio de desenvolvimento ou diferenciação celular (12). Assim, um mesmo complexo de Smad pode originar diferentes respostas celulares na presença de diferentes maquinarias de transcrição. Por último interessa referir que a actividade da via de sinalização do TGF- β é finamente regulada em várias etapas do processo e que esta regulação contribui significativamente para modular a resposta celular final (14). Neste ponto, é de salientar a acção de outras vias de transdução de sinal que podem influenciar a actividade de vários componentes desta via de sinalização (12,14).

Função no Sistema Vascular

O normal funcionamento de um organismo multicelular depende de um fornecimento regular de oxigénio e nutrientes aos seus tecidos, o qual é assegurado pelo sangue e por um sistema de vasos sanguíneos que o veicula. Este sistema vascular é composto por vários tipos celulares como: 1) as células endoteliais que formam o endotélio vascular, 2) e as células do músculo vascular liso e os pericitos que contribuem para a integridade da parede vascular. O processo de formação deste sistema divide-se em duas etapas distintas: a vasculogénese e

a angiogénese (3,19). A vasculogénese, a etapa inicial que ocorre ainda durante o desenvolvimento embrionário, consiste na diferenciação *in situ* de precursores indiferenciados, os angioblastos, em células endoteliais que se organizam numa rede vascular imatura, o plexus primitivo. Posteriormente durante a angiogénese observa-se o crescimento e remodelamento do plexus primitivo numa rede vascular complexa, pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes. O processo angiogénico pode ser, de grosso modo, dividido em duas fases distintas: 1) a fase de activação, em que os vasos sanguíneos são desestabilizados e as células endoteliais são estimuladas a proliferar e migrar dando origem a novos vasos, e 2) a fase de resolução ou maturação, em que a proliferação e migração das células endoteliais são inibidas e as células do músculo vascular liso e os pericitos são recrutados para os novos vasos, aí contribuindo para a estabilização e maturação das novas paredes vasculares. A transição entre estas duas fases é determinada por um balanço finamente regulado entre promotores e inibidores angiogénicos.

O desenvolvimento do sistema vascular implica a activação de várias vias de transdução de sinal nos vários tipos celulares envolvidos (3). Entre estas, assume particular importância, a via de sinalização do TGF- β . De facto, estudos recentes permitiram concluir que vários componentes desta via são essenciais para o desenvolvimento daquele sistema. Observou-se que ratinhos knock-out (ratinhos em que ambos os alelos de um gene são inactivados) para alguns dos componentes desta via, como por exemplo, o TGF- β 1, a Smad5 e a endogлина, morrem *in*

utero durante a fase embrionária devido a defeitos vasculares durante a vasculogênese e/ou angiogênese (8). Pode-se observar por exemplo: o aparecimento de vasos dilatados, frágeis e hemorrágicos, a ocorrência de malformações vasculares severas como malformações arteriovenosas, um remodelamento angiogênico defeituoso e a disrupção do recrutamento e manutenção das células do músculo vascular liso (21). Por outro lado, e conforme discutido abaixo, mutações em determinados componentes desta via de transdução de sinal estão implicadas no aparecimento e progressão de doenças vasculares.

No seu conjunto, estes dados sugerem que a via de sinalização do TGF- β desempenha uma função importante para o desenvolvimento do sistema vascular. Sabe-se que esta via de transdução de sinal, e em particular, as proteínas TGF- β regulam: 1) a actividade das células endoteliais estimulando a produção de matriz extracelular e controlando a sua proliferação e migração, e 2) o recrutamento dos pericitos e das células do músculo vascular liso (3,15). Estudos iniciais sugeriram de forma controversa que o factor TGF- β 1 poderia funcionar ou como inibidor da angiogênese ou como promotor angiogénico (9,17). Estes resultados controversos podem ser conciliados com base em estudos mais recentes que demonstraram em células endoteliais que 1) a citocina TGF- β 1 pode activar dois caminhos de sinalização distintos, e 2) que esses diferentes caminhos têm efeitos opostos na proliferação e migração de células endoteliais (9,18). O modelo corrente propõe então que o factor TGF- β 1 regule o estado do endotélio através de um balanço finamente regulado entre estas dois caminhos de sinaliza-

ção: 1) uma activa durante a fase de activação, teria uma função proangiogénica, e 2) a outra, activa na fase de resolução, teria uma acção antiangiogénica (9,18). Porém a controvérsia ainda subsiste, agora em relação à função de cada um destes caminhos de sinalização.

A via de sinalização do TGF- β em doenças vasculares

Ao controlar funções cruciais como o crescimento e morte celular, a via de sinalização do TGF- β desempenha um papel de relevo no aparecimento e desenvolvimento de certos tipos de cancro (6,13). Estima-se que praticamente todos os cancros do pâncreas e do cólon se encontram associados a mutações em componentes desta via (13). Para além de patologias cancerígenas, a via de transdução de sinal do TGF- β encontra-se ainda associada ao desenvolvimento de outras doenças (2,13). Entre estas incluem-se doenças vasculares como a telangiectasia hemorrágica hereditária e a hipertensão pulmonar primária que serão aqui sumariamente abordadas.

A telangiectasia hemorrágica hereditária, também conhecida por síndrome de Rendu-Osler-Weber e abreviada para HHT a partir do inglês *hereditary hemorrhagic telangiectasia*, é uma doença autossómica dominante (2,13,15). Esta doença é caracterizada inicialmente por displasias vasculares que resultam posteriormente em telangiectasias muco-cutâneas, corrimento recorrente de sangue do nariz e hemorragias gastrointestinais. Pode-se ainda observar a ocorrência de malformações arteriovenosas em vários órgãos como o pulmão, o fígado e o cérebro. Actualmente encon-

tram-se caracterizadas duas formas da doença identificadas por HHT1 e HHT2. Estas formas encontram-se associadas a mutações em componentes distintos da via de sinalização do TGF- β , a endogлина no caso da HHT1 e o receptor de tipo I, Alk1 (abreviatura do inglês, *Activin receptor-like kinase 1*), para a HHT2. Estes dados reforçam o conceito discutido anteriormente de que ambos estes genes são essenciais para o sistema vascular. Tendo em conta de que estes dois fatores são expressos em células endoteliais, estes dados sugerem ainda que estes componentes poderão operar na transdução de sinais similares e essenciais para a função das células endoteliais (2).

A hipertensão pulmonar primária, abreviada para PPH a partir do inglês *primary pulmonary hypertension*, é uma doença que, como o próprio nome indica, se encontra confinada à vasculatura pulmonar (4,13,15). Esta doença é caracterizada pelo aumento da resistência vascular pulmonar associado a falha do ventrículo direito na ausência de outros processos de doença. Entre as várias lesões possíveis, pode observar-se a obstrução de arteríolas pulmonares precapilares como resultado da proliferação de células endoteliais e células do músculo vascular liso. A PPH pode apresentar-se sob uma forma esporádica (mais comum) ou sob uma forma familiar autossômica dominante. Estudos recentes demonstraram que estas duas formas podem ter uma etiologia comum associada a mutações no gene do receptor de tipo II das proteínas BMP, o BMPR-II. Porém, estas mutações estão presentes apenas em menos de metade dos doentes com PPH e de entre estes, nem todos apresentam manifestações patológicas. Estes da-

dos sugerem que outras causas genéticas e/ou ambientais possam estar associadas com os restantes casos. De qualquer forma, estes resultados reforçam a ideia de que as proteínas BMP podem desempenhar um papel de relevo na organização e funcionamento do sistema vascular (4,13,15). De acordo com este conceito, ratinhos knock-out para o gene da Smad6 (Smad inibidora específico para a sinalização das proteínas BMP) apresentam defeitos cardiovasculares, muito embora sejam viáveis (7).

CONCLUSÕES

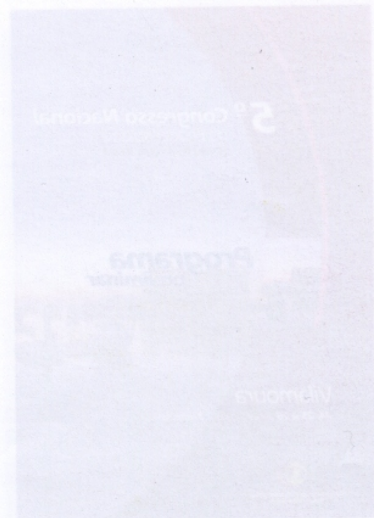
A via de sinalização do TGF- β desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção do sistema vascular. Vários componentes desta via encontram-se envolvidos neste processo e alguns destes são centrais em manifestações patológicas vasculares. O estudo bioquímico e celular desta via de sinalização contribuirá certamente para a maior compreensão das suas funções no sistema vascular e dos mecanismos bioquímicos que estão na base do aparecimento e desenvolvimento dessas patologias vasculares.

Referências

1. Attisano L, Wrana JL. Smads as transcriptional modulators. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 235-243.
2. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish F. Role of transforming growth factor- β in human disease. *The New England Journal of Medicine* 2000; 342 (18): 1350-1358.
3. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 2000; 6 (3): 389-395.
4. De Caestecker M, Meyrick B. Bone morphogenetic proteins, genetics and the

pathophysiology of primary pulmonary hypertension. *Respir Res* 2001; 2: 193-197.

5. Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin C-H, Kern SE, Massagué J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang X-F. Cell (1996) Nomenclature: vertebrate mediators of TGF- β family signals. 87: 173.
6. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signalling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet* 2001; 29: 117-129.
7. Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA, Meyer RI, Paul RJ, Lorenz JN, Fairchild-Huntress V, Dixon KL, Dunmore JH, Gimbrone Jr. MA, Falb D, Huszar D. A role for Smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nature Genet* 2000; 24: 171-174.
8. Goumans M-J, Mummery C. Functional analysis of the TGF- β receptor/smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 2000; 44: 253-265.
9. Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P.: Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO J* 2002; 21 (7): 1743-1753.
10. Itoh S, Itoh F, Goumans M-J, ten Dijke P. Signalling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6954-6967.
11. Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791.
12. Massagué J. How cells read TGF- β signals. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 169-178.
13. Massagué J, Blain SW, Lo R. TGF- β signalling in growth control, cancer and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309.
14. Massagué J, Chen Y-G. Controlling TGF- β signalling. *Genes Dev* 2000; 14: 627-644.
15. Miyazono K. Regulation of Transforming Growth Factor- β signalling and vascular diseases. *Cornea* 2002; 21 (Suppl. 2): S48-S53.
16. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin C-H. Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114: 4359-4369.
17. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8 (1): 21-43.
18. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- β 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *PNAS* 2000; 97 (6): 2626-2631.
19. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
20. ten Dijke P, Goumans M-J, Itoh F, Itoh S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 2002; 191: 1-16.
21. Vargesson N, Laufer E. Smad7 misexpression during embryonic angiogenesis causes vascular dilation and malformations independently of vascular smooth muscle cell function. *Dev Biol* 2001; 240: 499-516.



	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	TOTAL
HDLc isolada	9	2	10							21
TOTAL	28	60								88