

## Efecto modulador de los glucocorticoides sobre la angiogénesis mediada por PI3K/Akt activada por $\alpha 7$ -nAChR: Una revisión narrativa

### Modulatory effect of glucocorticoids on angiogenesis through the $\alpha 7$ -nAChR-activated PI3K/Akt signaling pathway: A narrative review

Matías Latorre de Halleux<sup>1</sup> , Bastián Hernández Vivanco<sup>1</sup> , Paulina Carvajal Vidal<sup>3</sup> , Magdalena Cortés Saavedra<sup>1,2,\*</sup> 

#### Resumen

**Introducción:** los glucocorticoides (GC) han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de patologías oculares debido a sus efectos antiinflamatorios y anti-angiogénicos. Se ha sugerido que el mecanismo de acción anti-angiogénico de los GC puede estar relacionado con la enzima fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la cual desempeña un papel crucial en la angiogénesis mediada por el receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 ( $\alpha 7$ -nAChR). La PI3K es una enzima lipoproteica heterodimérica compuesta por las subunidades; reguladora (p85) y catalítica (p110). **Objetivo:** esta revisión examina la evidencia de cómo los GC modulan la vía de señalización de PI3K activada por  $\alpha 7$ -nAChR en el proceso de angiogénesis *in vitro*. **Metodología:** se realizó una revisión bibliográfica utilizando los motores de búsqueda *PubMed* y *Web of Science*, relacionando los conceptos “*endothelial cell*”, “ $\alpha 7$ -nAChR”, “PI3K” y “*glucocorticoid*”. **Resultados:** se seleccionaron 30 artículos que informaron sobre la expresión de  $\alpha 7$ -nAChR y PI3K en células endoteliales humanas. Además, del efecto de dexametasona sobre las subunidades de PI3K y Akt (proteína cinasa B) en modelos humano, murino y porcino. A partir de estos hallazgos, se propuso un mecanismo mediante el cual los GC ejercen su efecto anti-angiogénico a través de la modulación en la expresión de la subunidad inhibitoria p85 de PI3K activada por  $\alpha 7$ -nAChR en células endoteliales humanas. **Conclusión:** los antecedentes evidencian que dexametasona, ejerce su mecanismo de acción anti-angiogénico mediante el incremento de la expresión de la subunidad inhibitoria p85 de PI3K activada por  $\alpha 7$ -nAChR.

**Palabras clave:**  $\alpha 7$ -nAChR; angiogénesis; células endoteliales; glucocorticoide; HUVEC; PI3K.

#### Abstract

**Introduction:** glucocorticoids (GC) have been widely used in the treatment of ocular pathologies due to their anti-inflammatory and anti-angiogenic effects. It has been suggested that the anti-angiogenic mechanism of GC may be related to the enzyme phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), which plays a crucial role in angiogenesis mediated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor ( $\alpha 7$ -nAChR). PI3K is a heterodimeric lipoprotein enzyme composed of regulatory (p85) and catalytic (p110) subunits. **Objective:** this review examines the evidence of how the GC modulate the PI3K signaling pathway activated by  $\alpha 7$ -nAChR in the process of *in vitro* angiogenesis. **Methodology:** a literature search was conducted using the PubMed and Web of Science search engines, relating the concepts of “*endothelial cell*”, “ $\alpha 7$ -nAChR”, “PI3K”, and “*glucocorticoid*”. **Results:** thirty-two articles were selected that reported on the expression of  $\alpha 7$ -nAChR and PI3K in human endothelial cells. Furthermore, the effect of dexamethasone on PI3K and Akt (protein kinase B) subunits was documented in human, murine, and porcine models. Based on these findings, a mechanism was proposed whereby GC exert their anti-angiogenic effect through modulation of the expression of the inhibitory p85 subunit of PI3K activated by  $\alpha 7$ -nAChR in human endothelial cells. **Conclusion:** background evidence suggests that dexamethasone exerts its anti-angiogenic mechanism of action by increasing the expression of the  $\alpha 7$ -nAChR-activated PI3K inhibitory subunit p85

**Keywords:**  $\alpha 7$ -nAChR; angiogenesis; endothelial cells; glucocorticoid; HUVEC; PI3K.

Fecha de envío: 2023-12-29 - Fecha de aceptación: 2024-06-14

(1) Laboratorio Bioquímica Celular y Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Valparaíso. Valparaíso. Chile.

(2) Centro de Investigación Farmacopea Chilena (CIFAR). Universidad de Valparaíso. Valparaíso. Chile.

(3) Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y Físicoquímica. Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

\*Autor de correspondencia: [magdalena.cortes@uv.cl](mailto:magdalena.cortes@uv.cl)



## Introducción

Los glucocorticoides (GC) son hormonas esteroidales ampliamente utilizadas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluidas las oculares, mediante diversas vías de administración como tópica, sistémica, periocular e intraocular (Gaballa *et al.*, 2021). Debido a su alta liposolubilidad, los GC interactúan con dianas biológicas en el citosol y el núcleo celular, regulando así procesos inflamatorios y angiogénicos (Timmermans *et al.*, 2019; Langendorf *et al.*, 2021). La angiogénesis, un proceso crucial que implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, comprende etapas clave como migración, proliferación y formación de estructuras tubulares, en las cuales las células endoteliales juegan un papel fundamental (Adams & Alitalo, 2007).

Los GC exhiben efectos anti-angiogénicos y anti-inflamatorios, lo que los convierte en una alternativa al tratamiento con agentes anti-factor de crecimiento endotelial vascular (en inglés anti-vascular endothelial growth factor, anti-VEGF) en pacientes con edema macular diabético (Schwartz *et al.*, 2016). No obstante, se ha observado que el uso de anti-VEGF puede conllevar riesgos de efectos adversos oculares, como la formación de catarata y el aumento de la presión intraocular (Gaballa *et al.*, 2021). Esta revisión proporciona una comprensión del mecanismo de acción de los GC en la angiogénesis, así como su interacción con una molécula pro-angiogénica.

En este contexto, ha surgido una nueva diana farmacológica asociada al proceso angiogénico, el receptor de acetilcolina nicotínico subtipo alfa 7 ( $\alpha 7$ -nAChR). Este receptor, una vez activado por un agonista colinérgico, induce migración (Ng *et al.* 2007), proliferación (Wu *et al.*, 2009) y formación de estructuras tubulares en las células endoteliales (Dom *et al.*, 2011). El  $\alpha 7$ -nAChR es un receptor ionotrópico homopentamérico, caracterizado por su alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  (Cortés *et al.*, 2014). La elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activa diversas cinasas, siendo la enzima fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato-3-cinasa (PI3K) una de las protagonistas en este proceso (Wu *et al.*, 2009).

La PI3K es una familia de enzimas cinasas que, al activarse, desencadenan la fosforilación de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) para convertirlo en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato ( $\text{PIP}_3$ ), lo que inicia una cascada de señalización intracelular que conduce a la activación de la proteína cinasa B (Akt) (Zhang *et al.*, 2019). La

isoforma IA de PI3K consta de la subunidad inhibitoria/regulatoria (p85) que forma un heterodímero con la subunidad catalítica (p110) (Rathinaswamy *et al.*, 2021). La interacción de la subunidad p85 estabiliza a p110 e inhibe su actividad basal, p85-p110.

Esta revisión narrativa tiene como objetivo explorar la expresión de  $\alpha 7$ -nAChR, PI3K, así como el efecto del GC sobre la angiogénesis mediada por  $\alpha 7$ -nAChR, con especial atención en la vía de señalización PI3K en modelos *in vitro*.

## Metodología

Se realizó una revisión bibliográfica narrativa mediante los motores de búsqueda: *PubMed* y *Web of Science*. La búsqueda se realizó usando el operador booleano AND y los términos: "PI3K", "corticosteroid", "angiogenesis", "in vitro", " $\alpha 7$ -nAChR", "HUVEC" (del inglés, *human umbilical vein endothelial cells*), "dexamethasone", y "endothelial cell". Los criterios de inclusión consideraron artículos científicos (fuentes primarias), estableciendo los últimos 20 años (2004 - 2023) e idioma inglés. Los criterios de exclusión fueron aquellas publicaciones del tipo artículos de revisión, informes cortos o cartas, estudios de caso, metodologías, entre otros.

## Resultados

Se obtuvo un total de 30 artículos, de los cuales 9 abordan el efecto de dexametasona sobre la vía de señalización PI3K/Akt, 12 corresponden a investigación de  $\alpha 7$ -nAChR y PI3K en el endotelio humano y otros 9 se centran en el efecto de GC en el proceso angiogénico en endotelio vascular humano.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los efectos de dexametasona, un tipo de GC, sobre las subunidades de PI3K (p85, p110), Akt y su forma fosforilada (p-Akt) en diferentes modelos *in vitro*. Estos modelos incluyeron células epiteliales renales porcinas, queratinocitos murinos, y algunas líneas celulares humanas, como HUVEC, entre otras. Los estudios evaluaron una variedad de concentraciones de dexametasona, que oscilan entre 50 nM y 1  $\mu\text{M}$ , con tiempos de exposición hasta 72 horas. En la mayoría de los estudios analizados, se observó consistentemente un incremento significativo en la expresión de la subunidad p85 y una reducción en los niveles de p-Akt. Estos hallazgos sugieren una clara inhibición de la actividad de Akt.

**Tabla 1:** efecto de Dexametasona sobre las subunidades de PI3K (p85, p110) y Akt en modelos "in vitro" humano, murino y porcino.

Modelo <i>in vitro</i>	Dexametasona	Tiempo de exposición (h)	p85	p110	Akt	p-Akt	Referencias
<b>porcino</b>							
LLC-PK1-GR101	50 nM	24	↑↑	±	±	↓↓	Wang <i>et al.</i> , 2007
<b>murino</b>							
BMMcT RBL-2H3	5 - 100 nM	6 - 18	–	±	±	↓↓	Andrade <i>et al.</i> , 2004
QM	1 µM	0,5	↑	–	±	↓↓	Leis <i>et al.</i> , 2004
MC3T3-E1	1 µM	12; 24; 48	↑	–	±	↓↓	Pan <i>et al.</i> , 2019
C2-C12	1 µM	6; 24; 72	↑↑	–	±	↓↓	Kuo <i>et al.</i> , 2012
C2-C12	100 nM	24	–	–	±	↓↓	Xie <i>et al.</i> , 2018
<b>humano</b>							
HL-60	100 nM	1	±	–	±	↓	Han <i>et al.</i> , 2022
CA549	100 nM	24	↑	–	±	↓↓	Arancibia <i>et al.</i> , 2011
<b>co-cultivo</b>							
HUVEC-rBMSC	700 nM	72	–	–	±	↓	Chai <i>et al.</i> , 2020

Abreviaciones: **BMMcT**: línea de mastocito derivado de médula ósea derivado de ratón; **C2-C12**: línea celular de mioblastos de músculo esquelético de ratón; **CA549**: Células epitelio alveolar humana; **HL-60**: Células de leucemia promielocítica humana; **HUVEC-rBMSC**: Cocultivo de células endoteliales de vena umbilical humana con células mesenquimales derivadas de la médula ósea de rata; **LLC-PK1-GR101**: Células epiteliales renales porcinas transfectadas con plásmido para expresar el receptor de glucocorticoide; **MC3T3-E1**: Línea de Células osteoblásticas murinas; **QM**: Queratinocitos murinos; **RBL-2H3**: células 2H3 de leucemia de basófilo de rata; ↑ aumento; ↓ disminución; ± : sin cambio; – : No se evaluó.

Dado que existe una escasa evidencia científica sobre el efecto de GC sobre el proceso de angiogénesis mediado por  $\alpha 7$ -nAChR en el endotelio, este estudio se enfocó en analizar qué tipos de endotelios humanos expresan  $\alpha 7$ -nAChR y/o PI3K. Además, se clasificaron según el tipo de endotelio (continuo y fenestrado), el tejido u órgano al que pertenecen y el tipo de vaso sanguíneo.

En la Tabla 2, se muestran las células endoteliales humanas de macrovasculatura como la aorta, la arteria coronaria y la arteria pulmonar, que son vasos sanguíneos de mayor calibre encargados de transportar sangre desde el corazón hacia los tejidos periféricos. Respecto a las células endoteliales de la arteria coronaria, no hay evidencia científica que avale la expresión de  $\alpha 7$ -nAChR, de ser así, esto sugeriría una posible variación funcional en la regulación de la angiogénesis en comparación con otros tipos de vasos. Las HUVEC,

que se encuentran en el cordón umbilical, desempeñan un papel crucial en el desarrollo embrionario, que expresan el  $\alpha 7$ -nAChR y PI3K sugiere su implicación en la angiogénesis durante el desarrollo fetal.

Por otro lado, células endoteliales microvasculares humanas de la *dermis* y glomerulares renales, son representantes de vasos sanguíneos de pequeño calibre, presentes en tejidos periféricos y microambientes específicos. La expresión de  $\alpha 7$ -nAChR y PI3K en estos tipos de vasos sugiere su contribución a la regulación de la angiogénesis en estos entornos particulares, así como la angiogénesis renal y la regulación de la función glomerular.

Finalmente, se destaca la evidencia científica que muestra la expresión de  $\alpha 7$ -nAChR y PI3K en células endoteliales de la retina humana (HREC), lo que sugiere su posible relevancia clínica en el tratamiento ocular.

**Tabla 2:** expresión de  $\alpha 7$ -nAChR (a) y PI3K (b) en modelos *in vitro* de células endoteliales humanas.

Tipo de endotelio	Tejido u órgano	Tipos de vasos sanguíneos	Modelo <i>in vitro</i>	Referencias
Continuo	Sistema circulatorio	Microvasculatura	HMEC	a. Ng <i>et al.</i> , 2007; b. Wang <i>et al.</i> , 2020
		Arteria general	HAoEC	a.b. Kakinuma <i>et al.</i> , 2010
		Arteria coronaria	HCAEC	a. Smedlund <i>et al.</i> 2011; b. Abid <i>et al.</i> , 2004
	Piel	Microvasculatura	HMVDECs	a. Wu <i>et al.</i> , 2009; b. Zhang <i>et al.</i> , 2005
	Cordón umbilical	Vena umbilical	HUVEC	a. Wu <i>et al.</i> , 2009; b. Abid <i>et al.</i> , 2004
	Ojo (BHR)	Microvasculatura	HREC	a. Wu <i>et al.</i> , 2009; b. Li <i>et al.</i> , 2021
		Microvasculatura	HRMEC	a. Dom <i>et al.</i> , 2011; b. Dailey <i>et al.</i> , 2021
Fenestrado	Pulmón	Arteria	HPAEC	a. Wu <i>et al.</i> , 2009; b. Shi <i>et al.</i> , 2023
		Riñón	Capilar glomerular	HRGEC

Abreviaciones: **BHR**: barrera hemato-retiniana; **HAoEC**: Célula endotelial aórtica humana; **HBMECs**: Células endoteliales microvasculares de cerebro; **HCAEC**: Célula endotelial arteria coronaria humana; **HMVDECs**: Células endoteliales microvasculares dérmicas humanas; **HMEC**: Célula endotelial microvascular humana; **HPAEC**: Células endoteliales arteria pulmonar humana; **HREC** o **HRMEC**: Células endoteliales microvasculares de la retina humana; **HRGEC**: Célula endotelial glomerular renal humana; **HUVEC**: Célula endotelial de vena umbilical humana.

Después de analizar la expresión de  $\alpha 7$ -nAChR y PI3K en diversos tipos de endotelios, así como los efectos moduladores de la dexametasona en estas vías en diferentes modelos celulares, ampliamos nuestra investigación para examinar el impacto de los GC en la angiogénesis (Tabla 3). Durante esta etapa, se recopiló información sobre cómo diferentes concentraciones, y tiempos de exposición a los GC afectan directamente los procesos angiogénicos clave, como migración, proliferación y formación de estructuras tubulares. Se observaron

disminuciones significativas en la migración y proliferación celular con dexametasona a concentraciones de 0.1  $\mu$ M después de exposiciones de 24 y 48 horas. Además, se encontró una inhibición en la formación de estructuras tubulares a concentraciones de 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. Por otro lado, se reportó una disminución en la proliferación celular con hidrocortisona a concentraciones entre 10 nM y 30 nM. A concentraciones más altas (2 mM), se observó una reducción significativa tanto en la migración como en la proliferación celular.

**Tabla 3:** efecto de glucocorticoide sobre el proceso angiogénico en HUVEC.

Corticoide	Concentración	Tiempo exposición (h)	Modulación angiogénica			Referencias	
			Migración	Proliferación	Formación de túbulos		
Cortisol <sup>1</sup> , Dexametasona <sup>2</sup>	0,006 $\mu$ M	4, 8, 10, 22	$\pm$ <sup>1</sup>	$\pm$ <sup>1</sup>	$\downarrow\downarrow$ <sup>1,2</sup>	Logie <i>et al.</i> , 2010	
	0,1 $\mu$ M	24, 48	$\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow$	Chai <i>et al.</i> , 2020	
	1 $\mu$ M	48	$\downarrow\downarrow$	–	$\downarrow\downarrow$	Igarashi <i>et al.</i> , 2013	
	Dexametasona	10 $\mu$ M	18, 72	–	–	$\downarrow\downarrow\downarrow$	Moreira <i>et al.</i> , 2023
	10 y 100 $\mu$ M	24, 48	–	$\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	Langendorf <i>et al.</i> , 2021	
Hidrocortisona	1 pM-1 mM	–	–	–	$\downarrow$	Ljoki <i>et al.</i> , 2022	
	10, 20 y 30 nM	–	$-\downarrow$	–	$\downarrow$	Goding, 2009	
	40 nM-4 $\mu$ M	–	–	–	$\pm$	Huttala <i>et al.</i> , 2015	
	2 mM	48	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow$	–	Zuo <i>et al.</i> , 2020	

Abreviaciones:  $\uparrow$  : aumento;  $\downarrow$  : disminución;  $\pm$  : sin cambio; – : No se evaluó.

## Discusión

### El efecto de la Dexametasona sobre PI3K y Akt en modelos *in vitro* humanos, murinos y porcinos

Se ha investigado la relación entre los GC, la insulina y la vía PI3K/Akt. Al respecto, Wang *et al.* (2007)

evaluaron el efecto de dexametasona en ausencia y presencia de insulina, observando que en presencia de insulina se incrementa la actividad de PI3K no obstante en presencia de GC este efecto disminuye significativamente, disminuyendo la relación p-Akt/ Akt total. Asimismo, observan que en presencia de 50 nM de dexametasona aumenta la expresión de p85 $\alpha$  de PI3K, sin cambios en la subunidad catalítica p110, en una línea celular epitelial renal de porcino transfectada con un plásmido con expresión del receptor de GC. Kuo *et al.* (2012), identificaron la red transcripcional regulada por los GC en tubos musculares, destacándose el rol crítico que juega la subunidad p85 en la resistencia a insulina inducida por los GC y la atrofia muscular, utilizando una línea celular de mioblastos de músculo esquelético de ratón.

Por otra parte, también se ha evaluado la interacción entre los GC y la tumorigénesis. Leis *et al.* (2004). revelaron una sobreexpresión de receptores de GC en tumorigénesis cutánea utilizando un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa el receptor de GC, demostrando que esta sobreexpresión se correlaciona inversamente con la fosforilación de Akt. Esto indica que la interacción entre GC/PI3K/Akt constituye un mecanismo subyacente al efecto antitumoral de los GC en extractos cutáneos de células.

En el contexto de la respuesta inmunitaria, se ha investigado cómo la dexametasona suprime la activación de los mastocitos o basófilos. Andrade *et al.* (2004) utilizaron una línea celular de mastocitos derivada médula ósea, las que incubaron con dexametasona, en un rango de 5 a 100 nM. Observaron una reducción significativa en la actividad de PI3K, sin cambio en la expresión de Akt pero con una disminución significativa de Akt fosforilada.

Por otra parte, considerando que los GC se han utilizado en las terapias de enfermedades obstructivas crónicas, se ha estudiado el efecto de los GC sobre los receptores tipo-toll, que participan

en la respuesta inmune innata mediante la vía PI3K/Akt. Lo que es evidenciado por Arancibia *et al.* (2011), quienes evaluaron dexametasona, encontrando que disminuye la fosforilación de Akt, en células epiteliales alveolares humana, efecto que no se observó al incubarlas con RU486 (mifepristona, inhibidor de GC). Por último, Han *et al.* (2022) reportaron que dexametasona disminuye el cociente p-p85/p85 y p-Akt/Akt, en células HL-60 diferenciadas a tipo neutrófilo, previamente estimuladas con factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, lo cual está en concordancia con la disminución de las fosforilaciones antes descritas.

### **Regulación angiogénica en células endoteliales humanas: Explorando la expresión de $\alpha 7$ -nAChR y PI3K**

En el sistema circulatorio, se ha demostrado que VEGF un potente factor pro-angiogénico activa la vía de señales PI3K/Akt en las células endoteliales de la arteria coronaria humana (Abid *et al.*, 2004). Asimismo, Ng *et al.* (2007) observaron que el VEGF induce la migración de células endoteliales de la microvasculatura humana mediante la activación del receptor  $\alpha 7$ -nAChR, el cual se expresa en diversos lechos vasculares tal como cerebro, piel, ojo, pulmón, sistema circulatorio, cordón umbilical y riñón.

Por otro lado, Smedlund *et al.* (2011) identificaron la asociación del receptor  $\alpha 7$ -nAChR con otras vías de señalización tal como las vías cinasa *Janus* asociado a transductores de señal y activadores de transcripción y cinasas reguladoras de señales extracelulares, en células endoteliales de la arteria coronaria humana post-estímulo colinérgico.

Respecto a la expresión de PI3K en el sistema circulatorio, Wang *et al.* (2020) evaluaron su expresión al observar que quercetina, un tipo de flavonoide, inhibe la viabilidad celular microvascular, la migración y la formación de estructuras tubulares *in vitro*, mediado por la inhibición de la vía PI3K/Akt.

Un modelo *in vitro* particularmente relevante, es HUVEC, por su facilidad de obtención como material biológico de desecho, la conservación de las características del tejido de origen hasta el traspaso 3 (Cortés *et al.*, 2013), y la alta expresión del  $\alpha 7$ -nAChR (Wu *et al.*, 2009) y PI3K (Abid *et al.*, 2004), moléculas asociadas al proceso de angiogénesis.

En el ámbito ocular, para investigar la expresión de  $\alpha 7$ -nAChR, Wu *et al.* (2009) utilizaron el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real, identificando el ARN mensajero de  $\alpha 7$ -nAChR en HREC. Dom *et al.* (2011) corroboraron la expresión del receptor  $\alpha 7$ -nAChR en HREC utilizando la técnica de *Western blot*. Además, estos investigadores demostraron que la estimulación del  $\alpha 7$ -nAChR induce la formación de estructuras

tubulares, un modelo *in vitro* de angiogénesis. Estos hallazgos sugieren que el  $\alpha 7$ -nAChR desempeña un papel funcional en la regulación de la angiogénesis a nivel ocular.

Por otro lado, considerando la predominancia de VEGF en los endotelios oculares, Dailey *et al.* (2021) estimularon la vía PI3K/Akt con diferentes isoformas de VEGF en HREC, observando una activación máxima de Akt a los 30 minutos, evaluada mediante la expresión de la molécula por inmunofluorescencia. En otro estudio realizado por Li *et al.* (2021), se examinó la interrelación entre la molécula Anexina A2 y la vía PI3K/Akt en la neovascularización retinal. La anexina es un miembro de la familia de proteínas unidas a fosfolípidos dependientes de  $Ca^{2+}$  y se expresa en la mayoría de las células. Se observó que anexina A2 promueve la proliferación y migración de HREC a través de la vía PI3K/Akt. Estos hallazgos sugieren que, bajo condiciones específicas, es posible modular la neovascularización ocular, lo que sitúa al ojo como un blanco terapéutico viable para intervenciones pro o anti-angiogénicas mediadas por la vía PI3K/Akt.

### **El papel central de PI3K en la interacción entre glucocorticoides y $\alpha 7$ -nAChR en células endoteliales**

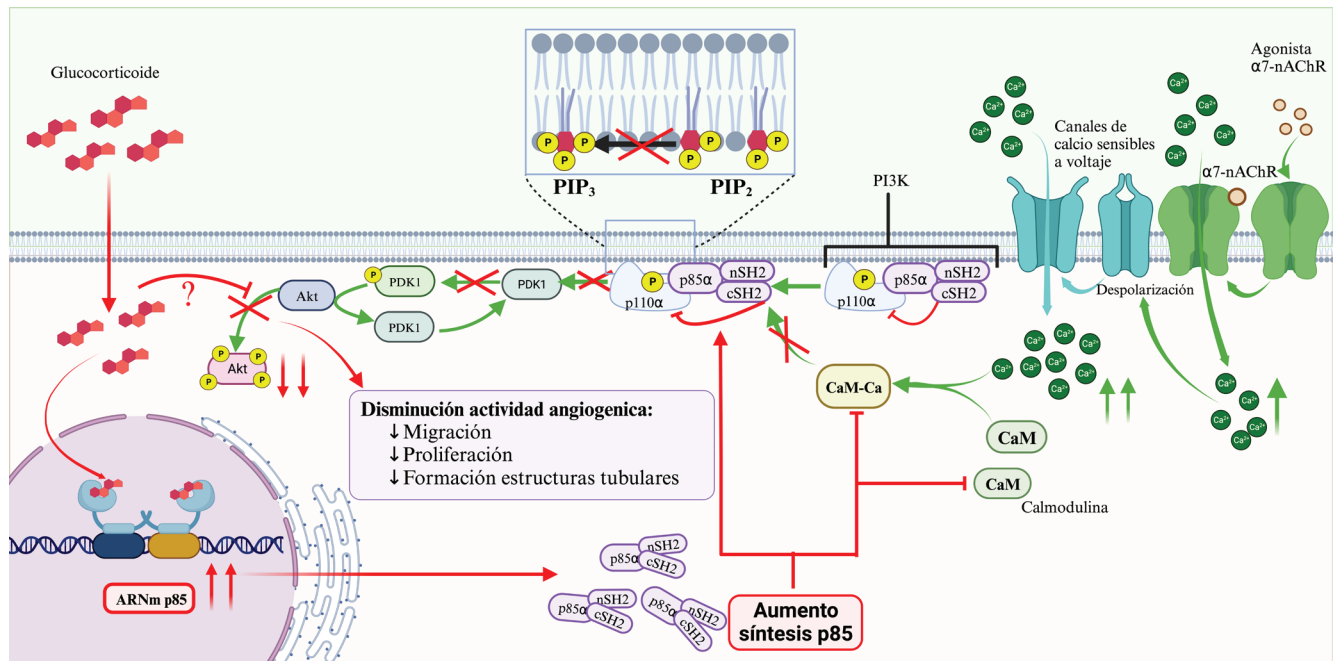
Considerando la capacidad de las células endoteliales para modular la liberación de factores angiogénicos, se seleccionó el modelo HUVEC a partir de la Tabla 2. Las HUVEC representan un cultivo primario que por tanto conserva las características del tejido original y presenta una expresión elevada de  $\alpha 7$ -nAChR (Wu *et al.*, 2009), una diana farmacológica clave asociada a la activación del proceso de angiogénesis, como se mencionó anteriormente.

En la Tabla 3 se entrega evidencia científica del efecto anti-angiogénico de los GC. Chai *et al.* (2020) observaron que la dexametasona, a una concentración de 0,1  $\mu M$ , inhibe significativamente la proliferación, migración y formación de estructuras tubulares en HUVEC. De acuerdo con Logie *et al.* (2010), el efecto anti-angiogénico de los GC parece estar relacionado con la prevención de la formación de estructuras tubulares en las células endoteliales, lo cual se evidenció al estudiar en tiempo real la formación de la red de túbulos en HUVEC. Por otro lado, Langendorf *et al.* (2021) concluyeron que los efectos anti-angiogénicos de la dexametasona se producen mediante una disminución en la liberación de VEGF en co-cultivo de mioblastos y HUVEC.

Finalmente, considerando que  $\alpha 7$ -nAChR, es de tipo inotrópico, el cual una vez activado por un agonista permite el ingreso principalmente de  $Ca^{2+}$ . Whang *et al.* (2018) reportaron que calmodulina (CaM), una proteína sensora de  $Ca^{+2}$ , una vez activada por el incremento de  $Ca^{2+}$  citosólico, puede interactuar con la subunidad reguladora p85, formando así el dímero CaM-p85. Se sugiere que esta unión

podría tener lugar tanto en el citosol como en la membrana, donde p85 inhibe a p110. La interacción de CaM-p85 podría generar un cambio conformacional que desactive p85, liberando la vía PI3K. En base a los antecedentes presentados, proponemos que la activación de  $\alpha 7$ -nAChR sensibiliza a CaM al activarse el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular, permitiendo la interacción de CaM con la subunidad inhibidora p85 de PI3K (Figura 1). Sin

embargo, en presencia de los GC, incrementa p85 desencadenando un desequilibrio positivo entre p85/CaM inhibiendo la vía PI3K, disminuyendo las fosforilaciones en la vía de señalización, como PDK1 y Akt, frenando así el proceso angiogénico. Nuestra revisión narrativa proporciona evidencia de que PI3K desempeña un papel crucial en la angiogénesis de células endoteliales inducida por agonistas colinérgicos y cómo es modulada por los GC.



**Figura 1:** propuesta del mecanismo del efecto de los glucocorticoides sobre la vía PI3K/Akt activada por  $\alpha 7$ -nAChR en el proceso de angiogénesis. La activación del receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 ( $\alpha 7$ -nAChR), tipo ionotrópico, permite la entrada de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) desde el medio extracelular, lo que desencadena la despolarización de la membrana plasmática. Esta despolarización induce la apertura de los canales de calcio activados por voltaje, lo que facilita la entrada de más  $\text{Ca}^{2+}$ . La calmodulina, un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , forma el complejo calmodulina- $\text{Ca}^{2+}$  (CaM-Ca), el cual interactúa con el heterodímero PI3K (p85-p110), liberando la subunidad catalítica p110. Esto activa la transducción de señales río abajo, lo que a su vez activa la proteína Akt y desencadena el proceso angiogénico. Sin embargo, en presencia de GC, hormonas esteroideas que interactúan con dianas biológicas en el citosol y el núcleo celular, incrementan la expresión de la subunidad inhibidora p85, lo que resulta en un desequilibrio positivo entre p85/CaM- $\text{Ca}^{2+}$ . Este desequilibrio puede llevar a la inhibición de la vía PI3K, lo que disminuiría las fosforilaciones en la vía de señalización, como Akt, y frenaría así el proceso angiogénico. Fuente: Elaboración propia. Creada mediante una licencia académica del software Biorender.com

Respecto al ámbito clínico, específicamente en contextos oculares, las nuevas terapias dirigidas han generado gran interés debido a su potencial para ofrecer tratamientos más específicos, menos tóxicos y con mayor biodisponibilidad de los fármacos. Recientemente, en España se han desarrollado geles de formación *in situ* que contienen nanopartículas poliméricas cargadas con fluorometolona (González *et al.*, 2019), un tipo de corticoide de uso oftalmológico para el tratamiento de alergias e inflamatorias oculares (Gaballa *et al.*, 2021). Más recientemente, se ha evaluado el aptámero AT11-10 con liberación intraocular, que actúa como co-receptor de varios factores de crecimiento, Moreira *et al.* (2023) asociaron al aptámero-dexametasona (10  $\mu\text{M}$ ) y compararon su efecto con dexametasona

sola, sobre la formación de estructuras tubulares en modelo de HUVEC. Observaron que ambos inhiben la formación de estructuras tubulares sin embargo no hay diferencia significativa entre ambas formulaciones.

Estos hallazgos son prometedores, pero se necesitan más estudios para evaluar la seguridad y eficacia a largo plazo de estas terapias dirigidas en modelos animales y ensayos clínicos. Además, se requieren investigaciones adicionales para identificar nuevos blancos terapéuticos potenciales y desarrollar estrategias terapéuticas combinadas que puedan ser más efectivas para modular la angiogénesis y tratar enfermedades relacionadas.

## Conclusión

La revisión destaca la compleja regulación angiogénica en células endoteliales humanas, centrándose en la expresión de  $\alpha 7$ -nAChR y PI3K. Se evidencia la presencia de  $\alpha 7$ -nAChR en diversos tejidos, incluido el ojo, sugiriendo el potencial terapéutico para intervenciones antiangiogénicas en patologías oculares. La vía PI3K/Akt, activada por  $\alpha 7$ -nAChR, se revela como un componente clave en la cascada de señalización asociada a la angiogénesis.

En cuanto al efecto de la dexametasona en modelos *in vitro* humano y animal, se observa una variada respuesta en la expresión de subunidades regulatorias de PI3K, como p85 $\alpha$ , y en la actividad de Akt. Estudios en células humanas indican que la dexametasona puede modular la síntesis de PIP3 y afectar la fosforilación de Akt, sugiriendo un papel crítico de PI3K en la respuesta anti-angiogénica. El modelo HUVEC emerge como fundamental para evaluar los efectos anti-angiogénicos de los glucocorticoides, especialmente la dexametasona. Los estudios revelan una disminución en la proliferación, migración y formación de estructuras tubulares de HUVEC bajo la influencia de dexametasona, sugiriendo un impacto significativo en el proceso angiogénico.

Finalmente, se propone un mecanismo anti-angiogénico que implica la interacción entre glucocorticoides,  $\alpha 7$ -nAChR, y PI3K. La expresión aumentada de la subunidad inhibitoria p85, bajo la estimulación de glucocorticoides, junto con la posible interacción de calmodulina con p85, sugiere un papel central de PI3K en la modulación del proceso angiogénico. Este hallazgo resalta el potencial terapéutico de dirigir PI3K en el tratamiento de patologías asociadas a la angiogénesis, especialmente en contextos oculares.

**Declaración de conflicto de interés:** los autores declaran no tener conflicto de interés y no haber recibido financiamiento externo de ningún tipo para realizar la investigación.

## Contribuciones de los autores:

Conceptualización: MLH, MCS; escritura, borrador original: MLH; redacción del artículo y revisión crítica relevante del contenido intelectual: MLH, BHV, MCS; edición, aprobación final de la versión que debe ser publicado: MLH, BHV, MCS; PCV.

## Referencias

Abid MR, Guo S, Minami T, Spokes KC, Ueki K, Skurk C, Walsh K & Aird WC. (2004). Vascular endothelial growth factor activates PI3K/Akt/forkhead signaling in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology: Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 294-300.

Adams RH & Alitalo K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 464-478.

Andrade MV, Hiragun T & Beaven MA. (2004). Dexamethasone suppresses antigen-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and downstream responses in mast cells. *The Journal of Immunology: J Immunol* **172**, 7254-7262.

Arancibia S, Benítez D, Núñez LE, Jewell CM, Langjahr P, Candia E, Zapata-Torres G, Cidlowski JA, González MJ & Hermoso MA. (2011). Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the glucocorticoid receptor upon TLR2 activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine: J Cell Mol Med* **15**, 339-349.

Chai M, Gu C, Shen Q, Liu J, Zhou Y, Jin Z, Xiong W, Zhou Y & Tan W. (2020). Hypoxia alleviates dexamethasone-induced inhibition of angiogenesis in cocultures of HUVECs and rBMSCs via HIF-1 $\alpha$ . *Stem Cell Research and Therapy* **11**, 1-13.

Chatterjee PK, Yeboah MM, Dowling O, Xue X, Powell SR, Al-Abed Y & Metz CN. (2012). Nicotinic acetylcholine receptor agonists attenuate septic acute kidney injury in mice by suppressing inflammation and proteasome activity. *PLoS ONE* **7**, e35361.

Cortés MP, Becerra JP, Vinet R, Álvarez R & Quintana I. (2013). Inhibition of ATP-induced calcium influx by homocysteine in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Biology International: Cell Biol Int* **9999**, 1-8.

Cortés MP, Álvarez R, Sepúlveda E, Jiménez F, Astudillo L, Vallejos G & Gutiérrez M. (2014). A new isoxazolic compound acts as  $\alpha 7$  nicotinic receptor agonist in human umbilical vein endothelial cells. *A Journal of Biosciences: Zeitschrift für Naturforschung C (ZNC): Z Naturforsch C J Biosci* **69**, 291-299.

Dailey W, Shunemann R, Yang F, Moore M, Knapp A, Chen P, Deshpande M, Metcalf B, Tompkins Q, Guzman AE, Felisky J & Mitton KP. (2021). Differences in activation of intracellular signaling in primary human retinal endothelial cells between isoforms of VEGFA 165. *Molecular Vision* **27**, 191-205.

Dom AM, Buckley AW, Brown KC, Egleton RD, Marcelo AJ, Proper NA, Weller DE, Shah YH, Lau JK & Dasgupta P. (2011). The  $\alpha 7$ -nicotinic Acetylcholine Receptor and MMP-2/-9 pathway mediate the proangiogenic effect of nicotine in human retinal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**, 4428-4438.

- Gaballa SA, Kompella UB, Elgarhy O, Alqahtani AM, Pierscionek B, Alany R & Abdelkader H. (2021). Corticosteroids in ophthalmology: drug delivery innovations, pharmacology, clinical applications, and future perspectives. *Drug Deliv. and Transl. Res* **11**, 866–893
- Goding AM. (2009). The effect of hydrocortisone on angiogenesis. *BIOS* **80**, 59-65.
- González R, Carvajal P, Halbault L, Calpena AC, Espina M & García ML. (2019). In-situ forming gels containing fluorometholone-loaded polymeric nanoparticles for ocular inflammatory conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **175**, 365-374.
- Han NR, Ko SG, Park HJ & Moon PD. (2022). Dexamethasone attenuates oncostatin M production via suppressing of PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling in neutrophil-like differentiated HL-60 cells. *Molecules* **27**, 129.
- Huttala O, Vuorenpää H, Toimela T, Uotila J, Kuokkanen H, Ylikomi T, Sarkanen JR & Heinonen T. (2015). Human vascular model with defined stimulation medium – a characterization study. *Alternatives to Animal Experimentation* **32**, 125-136.
- Igarashi J, Hashimoto T, Shoji K, Yoneda K, Tsukamoto I, Moriue T, Kubota Y & Kosaka H. (2013). Dexamethasone induces caveolin-1 in vascular endothelial cells: Implications for attenuated responses to VEGF. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **304**, 790-800.
- Kakinuma Y, Furihata M, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Katare RG & Sato T. (2010). Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **48**, 680-693.
- Kuo T, Lew MJ, Mayba O, Harris CA, Speed TP & Wang JC. (2012). Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. *PNAS* **109**, 11160-11165.
- Langendorf EK, Rommens PM, Drees P & Ritz U. (2021). Dexamethasone inhibits the pro-angiogenic potential of primary human myoblasts. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 7986.
- Leis H, Page A, Ramírez A, Bravo A, Segrelles C, Paramio J, Barettono D, Jorcano JL & Pérez P. (2004). Glucocorticoid receptor counteracts tumorigenic activity of Akt in skin through interference with the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Molecular Endocrinology* **18**, 303-311.
- Li C, Zhao Z & Zhao S. (2021). Annexin A2 promotes development of retinal neovascularization through PI3K/ AKT signaling pathway. *Current Eye Research* **47**, 579-589.
- Ljoki A, Aslam T, Friis T, Ohm RG & Houen G. (2022). In vitro angiogenesis inhibition and endothelial cell growth and morphology. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 4277.
- Logie JJ, Ali S, Marshall KM, Heck MM, Walker BR & Hadoke PW. (2010). Glucocorticoid-mediated inhibition of angiogenic changes in human endothelial cells is not caused by reductions in cell proliferation or migration. *PLoS ONE* **5**, e14476.
- Moreira D, Lopes-Nunes J, Santos FM, Campello MP, Oliveira MC, Paulo A, Tomaz C & Cruz C. (2023). Assessment of aptamer as a potential drug targeted delivery for retinal angiogenesis inhibition. *Pharmaceuticals* **16**, 751.
- Ng MK, Wu J, Chang E, Wang BY, Katzenberg-Clark R, Ishii-Watabe A & Cooke JP. (2007). A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**, 106-112.
- Pan JM, Wu LG, Cai JW, Wu LT & Liang M. (2019). Dexamethasone suppresses osteogenesis of osteoblast via the PI3K/Akt signaling pathway in vitro and in vivo. *Journal of Receptors and Signal Transduction* **39**, 80-86.
- Rathinaswamy MK, Dalwadi U, Fleming KD, Adams C, Stariha JT, Pardon E, Baek M, Vadas O, DiMaio F, Steyaert J, Hansen SD, Yip CK & Burke JE. (2021). Structure of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) p110 $\gamma$ -p101 complex reveals molecular mechanism of GPCR activation. *Science Advances* **7**, eabj4282.
- Shi Y, Liu J, Zhang R, Zhang M, Cui H, Wang L, Cui Y, Wang W, Sun Y & Wang C. (2023). Targeting Endothelial ENO1 (Alpha-Enolase) -PI3K-Akt-mTOR axis alleviates hypoxic pulmonary hypertension. *Hypertension* **80**, 1035-1047.
- Smedlund K, Tano JY, Margiotta J & Vazquez G. (2011). Evidence for operation of nicotinic and muscarinic acetylcholine receptor-dependent survival pathways in human coronary artery endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **112**, 1978-1984.
- Schwartz SG, Scott IU, Stewart MW & Flynn HW. (2016). Update on corticosteroids for diabetic macular edema. *Clinical Ophthalmology* **10**, 1723–1730.



- Timmermans S, Souffriau J & Libert C. (2019). A general introduction to glucocorticoid biology. *Frontiers in Immunology* **10**, 1545.
- Wang G, Zhang M, Jang H, Lu S, Lin S, Chen G, Nussinov R, Zhang J & Gaponenko V. (2018). Interaction of calmodulin with the cSH2 domain of the p85 regulatory subunit. *Biochemistry* **57**, 1917-1928.
- Wang, X., Hu, J., & Price, S. R. (2007). Inhibition of PI3-kinase signaling by glucocorticoids results in increased branched-chain amino acid degradation in renal epithelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **292**, C1874-C1879.
- Wang X, Xue X, Wang H, Xu F, Xin Z, Wang K & Qin W. (2020). Quercetin inhibits human microvascular endothelial cells viability, migration and tube-formation in vitro through restraining microRNA-216a. *Journal of Drug Targeting* **28**, 609-616.
- Wu JC, Chruscinski A, De Jesus-Perez VA, Singh H, Pitsiouni M, Rabinovitch M, Utz PJ & Cooke JP. (2009). Cholinergic modulation of angiogenesis: Role of the 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Cellular Biochemistry* **108**, 433-446.
- Xie Y, Perry BD, Espinoza D, Zhang P & Price SR. (2018). Glucocorticoid-induced CREB activation and myostatin expression in C2C12 myotubes involves phosphodiesterase-3/4 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **503**, 1409-1414.
- Zhang B, Cao H & Rao GN. (2005). 15(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid induces angiogenesis via activation of PI3K-Akt-mTOR-S6K1 signaling. *Cancer Research* **65**, 7283-7291.
- Zhang M, Jang H & Nussinov R. (2019). The mechanism of PI3Ka activation at the atomic level. *Chemical Science* **10**, 3671-3680.
- Zhang QX, Nakhaei-Nejad M, Haddad G, Wang X, Loutzenhiser R & Murray AG. (2011). Glomerular endothelial PI3 kinase- $\alpha$  couples to VEGFR2, but is not required for eNOS activation. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **301**, 1242-1250.
- Zuo W, Guo WS, Yu HC, Liu P & Zhang QD. (2020). Role of junction-mediating and regulatory protein in the pathogenesis of glucocorticoid-induced endothelial cell lesions. *Orthopaedic Surgery* **12**, 964-973.