

### **NF- $\kappa$ B activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability**

Activación de NF- $\kappa$ B y sobreexpresión del ligando Fas en sangre y placas de pacientes con aterosclerosis carotídea. Implicación potencial en la inestabilidad de la placa

**J.L. Martín-Ventura, L.M. Blanco-Colio, B. Muñoz-García, A. Gómez-Hernández, A. Arribas, L. Ortega, J. Tuñón y J. Egido**

*Stroke.* 2004;35:458-63.

**Antecedentes y objetivo.** La apoptosis está presente en las lesiones ateroscleróticas humanas. El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) está implicado en la regulación transcripcional de la proteína proapoptótica ligando Fas (FasL). Hemos analizado la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de FasL en placas ateroscleróticas y en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con estenosis carotídea.

**Métodos.** La activación de NF- $\kappa$ B y FasL y la expresión de caspasa-3 activa fue analizada en 32 placas carotídeas humanas. Se valoró la activación de NF- $\kappa$ B y el ARNm de FasL en PBMC de pacientes y voluntarios sanos. Determinamos si el partenolide, un inhibidor del NF- $\kappa$ B, regula la expresión de FasL y la citotoxicidad en células T humanas.

**Resultados.** La regiones inflamatorias de las placas mostraron un incremento en la activación de NF- $\kappa$ B ( $3.393 \pm 281$  frente a  $1.029 \pm 100$  núcleos positivos por mm<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ) y de la expresión de FasL ( $16 \pm 1,4\%$  frente a  $13 \pm 1,8\%$ ;  $p < 0,05$ ) y caspasa-3 activa ( $3,3 \pm 0,6\%$  frente a  $1,5 \pm 0,3\%$ ;  $p < 0,05$ ) comparada con el área fibrosa. El NF- $\kappa$ B activo y la proteína FasL colocalizaban en las células de las placas. En los PBMC obtenidos de los pacientes el día de la endarterectomía, la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de FasL aumentó significativamente comparado con los controles sanos ( $1,5 \pm 0,1\%$  frente a  $0,5 \pm 0,1\%$  y  $2,1 \pm 0,1\%$  frente a  $1,2 \pm 0,1\%$  unidades arbitrarias, respectivamente;  $p < 0,001$ ). Se observó una correlación significativa entre la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de FasL. En las células T activadas, el partenolide disminuyó la activación de NF- $\kappa$ B, la actividad del promotor de FasL y la expresión de ARNm. El partenolide también disminuyó la citotoxicidad de las células Jurkat activadas sobre las células sensibles a FasL.

**Conclusiones.** En los PBMC y en las lesiones ateroscleróticas de pacientes con estenosis carotídea tiene lugar una activación de NF- $\kappa$ B y una sobreexpresión de FasL. La vía NF- $\kappa$ B-FasL podría estar implicada en los mecanismos subyacentes responsables de la inestabilidad de la placa en humanos.

### **COMENTARIO**

Estudios recientes sobre el desarrollo y la morfología de las lesiones ateroscleróticas han demostrado que la muerte celular programada o apoptosis es un factor crucial en la aterogénesis. Los "ejecutores" centrales de esta forma de muerte celular son unas proteasas denominadas caspasas. Su activación y, por tanto, la inducción del proceso apoptótico, puede iniciarse a través de los denominados receptores de muerte celular, entre los que se incluyen miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ , tales como el sistema receptor Fas (CD95)/ligando Fas (FasL).

Los principales factores responsables de la activación de la apoptosis en células vasculares son el estrés oxidativo, la angiotensina-II y la hipercolesterolemia. Una vez iniciada la apoptosis, las consecuencias en la progresión de la lesión aterosclerótica pueden ser muy diversas según el tipo de célula vascular considerada. En el caso de las células endoteliales puede provocar la activación de la trombina, lo que aumenta el riesgo de aparición de trombosis y la adhesión de monocitos. En las células musculares lisas la apoptosis es habitualmente observada en la porción fibrosa de la lesión aterosclerótica, donde estas células producen colágeno, crucial para la estabilidad de la placa. A medida que progresa la apoptosis en las células musculares lisas, la cápsula fibrosa se vuelve más delgada, lo que puede provocar la rotura de la placa, formación de trombos y calcificación de la placa a partir de las células musculares lisas apoptóticas remanentes. Finalmente, la apoptosis de los macrófagos contribuye a la formación y la progresión del núcleo lipídico y promueve la trombosis en las lesiones ateroscleróticas.

La expresión de FasL se encuentra bajo el control de NF- $\kappa$ B. Esta familia de factores de transcripción desempeña un papel central en la respuesta inflamatoria regulando la producción de citocinas. En la mayoría de las células no activadas las proteínas que constituyen NF- $\kappa$ B se encuentran secuestradas en el citoplasma celular formando complejos con la familia de proteínas inhibidoras I $\kappa$ B. Los inducidores de NF- $\kappa$ B, entre los que se incluyen citocinas inflamatorias, especies reactivas del oxígeno y productos virales activan una I $\kappa$ B cinasa (IKK), que fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  y da lugar a la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  y a la liberación de proteínas NF- $\kappa$ B. Una vez liberados, los dímeros de NF- $\kappa$ B translocan al núcleo donde regulan la expresión de genes diana.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de FasL en placas ateroscleróticas y en PBMC de pacientes con estenosis carotídea. Los autores demuestran que las regiones más vulnerables de las placas ateroscleróticas humanas presentan un incremento de la actividad NF- $\kappa$ B, expresión de FasL y caspasa-3 activa. En los estudios en células mononucleares circulantes los autores demuestran que en los pacientes con aterosclerosis carotídea existe una mayor expresión de FasL y una mayor actividad NF- $\kappa$ B respecto a controles sanos y que ambas proteínas parecen estar asociadas. Aunque son necesarios estudios adicionales para

confirmar los datos presentados, las conclusiones de este estudio pueden abrir una nueva vía para inhibir o reducir los mecanismos implicados en la inestabilidad de la placa en pacientes con arteriosclerosis carotídea. El hecho de que un inhibidor de NF- $\kappa$ B, como el partenolide, provoque una reducción de la expresión de la proteína proapoptótica FasL permite aventurar que la utilización de fármacos capaces de bloquear la vía de NF- $\kappa$ B podría reducir la rotura de la placa. Es evidente que, puesto que las estatinas son reconocidos fármacos con capacidad para inhibir NF- $\kappa$ B, la inhibición de la expresión de FasL pueda contribuir a explicar parte de sus acciones ateroscleróticas, mejorando a través de este proceso la estabilidad de la placa. Es probable que los autores del estudio se encuentren actualmente estudiando esta posibilidad. En resumen, dado el papel que la vía NF- $\kappa$ B-FasL parece desarrollar en la rotura de la placa de ateroma, este interesante estudio establece una vía potencial para mejorar la estabilidad de la placa en humanos.

**M. Vázquez Carrera**

### **Paradoxical effect of smoking in the spanish population with acute myocardial infarction or instable angina. Results of the ARIAM register**

Efecto paradójico del tabaco en la población española con infarto agudo de miocardio o angina inestable. Resultados del registro ARIAM

**M. Ruiz-Bailén, E. Aguayo de Hoyos, A. Reina-Toral, J.M. Torres-Ruiz, M. Álvarez Bueno, F.J. Gómez Jiménez, for the ARIAM Group**

*Chest. 2004;125:831-40.*

**Objetivos.** El efecto paradójico del tabaco sobre el infarto agudo de miocardio (IAM) es un fenómeno que consiste en la reducción de la mortalidad de los fumadores en comparación con los no fumadores. No obstante, no se conoce si el beneficio de esta reducción de la mortalidad es debido al tabaco en sí mismo o a otras covariables. A pesar de la aceptación del efecto paradójico del tabaco sobre el IAM, no se conoce si ocurre un fenómeno similar en el caso de la angina inestable. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto paradójico del tabaco sobre el IAM y la angina inestable, y estudiar específicamente si el tabaco supone una variable pronóstica independiente.

**Métodos y resultados.** La población del estudio fue seleccionada a partir del estudio multicéntrico ARIAM (Análisis del Retraso en el Infarto Agudo de Miocardio), un registro de 29.532 pacientes con diagnóstico de angina inestable o IAM. Los fumadores eran más jóvenes, presentaban menos factores de riesgo cardiovascular, como diabetes o hipertensión, menos infartos previos, una clase de Killip y Kimball inferior, y una mortalidad, tanto cruda como ajustada, inferior en el IAM (*odds ratio* = 0,774; intervalo de confianza del 95%, 0,660-0,909; *p* = 0,002). Los fumadores con angina inestable eran más jóvenes, con menos hipertensión o diabetes. En análisis multivariado, no se encontró una mortalidad significativamente diferente.

**Conclusiones.** La reducción de mortalidad observada en fumadores con IAM durante su estancia en la UCI no puede explicarse únicamente por covariables clínicas, como la edad, el sexo, otros factores de riesgo cardiovascular, la clase de Killip y Kimball, o el tratamiento recibido. Por tanto, el tabaco puede tener un efecto beneficioso por lo que respecta a la reducción de la mortalidad en la población con IAM. Los bajos índices de mortalidad encontrados en fumadores con angina inestable no están soportados por el análisis multivariado. En este caso, las diferencias en mortalidad pueden explicarse por las otras covariables.

### **COMENTARIO**

En este trabajo, los autores revisan los datos de un amplio registro de pacientes que ingresan por angina o por IAM, y enfocan el análisis sobre el efecto del tabaquismo en la mortalidad a corto plazo tras el ingreso. La razón de este enfoque es la existencia de datos previos de diversos estudios que llaman la atención acerca de la menor mortalidad de los fumadores en la fase aguda del IAM, aunque no todos los estudios son coincidentes en este hecho.

Los resultados de este estudio son consistentes con la mayoría de los datos previos acerca de un paradójico efecto protector del tabaco en pacientes que ingresan con IAM<sup>1,2</sup>, pero también en el grupo de pacientes que ingresan con angina. Además, en el grupo de pacientes con IAM el efecto "protector" es independiente de otros aspectos, incluido el de la edad: de hecho y a pesar de que globalmente los pacientes fumadores con IAM son más jóvenes que los no fumadores con IAM (como grupo completo), los análisis grupo-específicos demuestran que la menor mortalidad de los fumadores se mantiene incluso cuando los pacientes se estratifican por grupos de edad. El único hallazgo relativamente inesperado, en relación con la información previa, es el de la mayor prevalencia de hipercolesterolemia entre los fumadores, mientras que en otros estudios se observa una menor prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular mayores entre los fumadores.

Por lo que respecta a los pacientes con angina, los resultados son similares, a excepción de que el tabaco por sí mismo no parece ser predictivo de la menor mortalidad observada.

Este conjunto de resultados, aparentemente paradójicos ya que el tabaco en sí mismo es un claro factor de riesgo cardiovascular mayor, e incluso es un buen predictor de mortalidad a medio o largo plazo (incluso en grupos de pacientes en los que la mortalidad aguda es inferior, como el actual), puede hacernos reflexionar sobre determinados aspectos del tabaco.

Un primer aspecto que llama la atención es la menor prevalencia de otros factores de riesgo entre los fumadores, lo que nos hace pensar en la mayor relevancia del tabaco, pero no sólo como factor de riesgo principal en este grupo de pacientes, sino también como desencadenante del episodio coronario agudo. De hecho, existen datos previos de que algunos de los efectos del tabaco están relacionados con hipercoagulabilidad e hiperreactividad vascular<sup>3</sup> (incluyendo un posible vasospasmo), procesos ambos que pueden ser, por lo menos, coadyuvantes de un accidente coronario agudo. Por otra parte, también existen estudios que demuestran que el tratamiento trombolítico es más eficaz en el tratamiento agudo de pacientes fumadores con IAM que en no fumadores<sup>4</sup>, lo que sigue siendo consistente con los previamente mencionados efectos sobre coagulación y reactividad vascular.

Otro de los aspectos relevantes de este estudio es el de que los pacientes fumadores parecen tener episodios de IAM que con frecuencia son menos "graves" que los no fumadores. Esta situación también es concordante con los mencionados efectos del tabaco y además con el hecho de que los fumadores suelen tener un cierto grado de hipoxia crónica, que probablemente favorezca un fenómeno de adaptación con un aumento de vascularización coronaria, de manera que un estado de hipercoagulabilidad agudo o un vasospasmo, con cierta frecuencia podría producir un área de lesión más pequeña, con mejor respuesta al tratamiento trombolítico, y en consecuencia con un mejor pronóstico agudo por lo que respecta a la mortalidad asociada con el accidente coronario.

De cualquier manera, y aunque en el estudio que se comenta no se realiza un seguimiento a largo plazo, en otros estudios con un planteamiento y hallazgos similares en la fase aguda, se constata que la supervivencia a 5 años es significativamente menor en fumadores que en no fumadores<sup>5</sup>.

**J.A. Gómez Gerique**

#### Bibliografía

- Angeja BG, Kermgard S, Chen MS, McKay M, Murphy SA, Antman EM, et al. The smoker's paradox: insights from the angiographic substudies of the TIMI trials. *J Thromb Thrombolysis*. 2002;13:133-9.
- Gourlay SG, Rundle AC, Barron HV. Smoking and mortality following acute myocardial infarction: results from the National Registry of Myocardial Infarction 2 (NRMI 2). *Nicotine Tob Res*. 2002;4:101-7.
- Adnot S. Tobacco: an atherogenic, thrombogenic or spasmogenic factor? *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1998;91:53-8.
- De Chillou C, Riff P, Sadoul N, Ethevenot G, Feldmann L, Isaaz K, et al. Influence of cigarette smoking on rate of reopening of the infarct-related coronary artery after myocardial infarction: a multivariate analysis. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:1662-8.
- Herlitz J, Karlsson BW, Sjolin M, Lindqvist J, Karlsson T, Caidahl K. Five-year mortality in patients with acute chest pain in relation to smoking habits. *Clin Cardiol*. 2000;23:84-90.

## Involvement of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB

Implicación del receptor huérfano derivado neuronal 1 (NOR-1) en el estímulo mitogénico inducido por las LDL en células musculares lisas vasculares: papel de CREB

**J. Rius, J. Martínez-González, J. Crespo y L. Badimón**

*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:697-702.

**Antecedentes y objetivo.** La migración y la proliferación de las células musculares lisas vasculares (VSMC) desempeñan un papel esencial en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular. Estudios previos han mostrado que la expresión del receptor huérfano derivado neuronal-1 (NOR-1) regula la proliferación de las VSMC<sup>1</sup>. Debido a que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) modulan la expresión de múltiples genes implicados en la proliferación celular y son el principal factor de riesgo asociado a la arteriosclerosis, el objetivo del presente trabajo fue determinar si NOR-1 está implicado en los efectos mitogénicos inducidos por las LDL en VSMC.

**Métodos y resultados.** En VSMC, las LDL estimularon la expresión de NOR-1 de manera dependiente del tiempo y de la dosis. La anulación de la expresión de NOR-1 tras el tratamiento con oligonucleótidos antisentido inhibió la síntesis de ADN inducida por las LDL en VSMC. En el aumento en la expresión de NOR-1 inducido por las LDL están implicadas diferentes vías de señalización, como los receptores acoplados a proteínas G, la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación de múltiples proteincinasas, como PKA, PKC, ERK1, ERK2 y p38. La adición de las LDL produjo la activación por fosforilación del factor de transcripción CREB, que se une al elemento de respuesta dependiente del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (CRE) presente en el promotor de NOR-1 y que es esencial en la activación de la expresión del mismo mediado por las LDL.

**Conclusión.** En la VSMC, las LDL estimularon la proliferación celular. El efecto mitogénico producido por las LDL se acompañó de un aumento de la expresión del receptor nuclear NOR-1 a través de un mecanismo dependiente del factor de transcripción CREB.

#### COMENTARIO

*La compleja patogenia de la aterosclerosis no puede adscribirse a un único factor, más bien parece multifactorial (dislipemia, obesidad, diabetes, etc.). La disfunción de la célula endotelial como consecuencia de diferentes estímulos aterogénicos es una de las principales alteraciones que predisponen a desarrollar arteriosclerosis. Este daño inicial promueve la adhesión y la migración transendotelial de leucocitos circulantes. Del mismo modo, una extrav-*

sación excesiva de LDL a la íntima arterial favorece la retención y la posterior modificación de éstas por elementos de la matriz extracelular; estas LDL modificadas son fagocitadas con enorme avidez por los macrófagos, que se van cargando de partículas lipídicas para adquirir un fenotipo espumoso. La posterior activación de los leucocitos de la íntima produce mediadores inflamatorios que promueven la proliferación y la migración de las células musculares lisas vasculares (VSMC), y contribuye con ello a la formación del ateroma<sup>2</sup>. En este contexto, el trabajo de Rius et al estudia el efecto mitogénico de las LDL sobre la VSMC aisladas de aortas humanas. En él se muestra por primera vez que la estimulación de la proliferación inducida por las LDL se ve acompañada de un aumento en la expresión del receptor nuclear huérfano NOR-1 y que éste es necesario para mantener la proliferación celular, pues la inhibición específica de su expresión se opone al aumento en la proliferación producida tras la adición de LDL al medio. NOR-1, junto con Nur77 y Nurr1, forma parte de la familia de receptores nucleares huérfanos NGFI-B, denominados así porque carece de ligando específico conocido. Estos genes se han implicado en la regulación neuroendocrina, la diferenciación neural, la regeneración hepática, la apoptosis celular y los estímulos mitogénicos en diferentes tipos celulares<sup>3</sup>. Tanto NOR-1 como Nur77 se encuentran expresados al alza en lesiones ateroscleróticas procedentes de pacientes con enfermedad coronaria, pero el posible papel de ambos receptores nucleares en el desarrollo de la arteriosclerosis se desconoce. Además de NOR-1, otros receptores nucleares, como PPAR, RXR, ROR y RAR, se han relacionado con el aumento de la estimulación de la proliferación de la VSMC y, por tanto, en el proceso aterogénico<sup>4,5</sup>.

En el trabajo de Rius et al se muestra que el aumento en la expresión del receptor nuclear NOR-1 tras la adición de LDL implica la activación de diferentes vías de señalización (proteincininas A y C, ERK1 y 2, p38, etc.). Finalmente, se muestra tras el análisis de la actividad promotorra de NOR-1 que los elementos de respuesta a AMPc (CRE) desempeñan un papel esencial en la activación de la expresión mediada por las LDL, pues la mutación específica de estos elementos inhibe el aumento en la expresión de NOR-1. Otro aspecto interesante del trabajo de Rius et al es que, si bien la estimulación de expresión de NOR-1 es potenciada especialmente por las LDL nati-

vas, otras lipoproteínas, como las LDL oxidadas o las VLDL son capaces también de activar su expresión, aunque en menor medida. Por esto, sería muy interesante estudiar también el efecto del colesterol libre sobre la activación en la expresión de NOR-1 y, con ello, poder discernir los efectos mediados por el receptor de LDL de la producida por el aumento en la disponibilidad de colesterol, el cual es necesario para estimular la proliferación celular<sup>6</sup>. Por último, destacar que el trabajo de Rius et al abre una importante área de estudio encaminada a esclarecer el papel de NOR-1 en la fisiopatología vascular. Algunos de los retos inmediatos serían determinar el ligando fisiológico que activa dicho receptor y el papel in vivo de NOR-1 en el desarrollo de la arteriosclerosis. Recientemente, Ponnio et al<sup>7</sup> generaron el ratón knockout para NOR-1, que no presentaba ningún defecto en el sistema cardiovascular, pero sí se demostró ser esencial en la proliferación de los canales semicirculares del oído interno. Un experimento obvio para determinar el papel de NOR-1 en el desarrollo de la arteriosclerosis sería cruzar este ratón con el knockout de la Apo E, un modelo ampliamente utilizado en el estudio de esta enfermedad. Este doble knockout podría despejar varias incógnitas sobre el papel de este factor nuclear en la biología vascular.

## C. Fernández Hernando

### Bibliografía

- Martínez-González J, Rius J, Castello A, Cases-Langhoff C, Badimon L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. Circ Res. 2003;92:96-103.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature. 2000;407:233-41.
- Maruyama K, Tsukada T, Ohkura N, et al. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). Int J Oncol. 1998; 12:1237-43.
- Miano JM, Topouzis S, Majesky MW, Olson EN. Retinoid receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. Circulation. 1996;93:1886-95.
- Staelens B, Koenig W, Habib A, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPAR-gamma activators. Nature. 1998;393:790-3.
- Martínez-Botas J, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, La-sunción MA. Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2. Faseb J. 1999;13:1359-70.
- Ponnio T, Burton Q, Pereira FA, Wu DK, Conneely OM. The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. Mol Cell Biol. 2002;22:935-45.