

### ***La producción de superóxido dependiente de NADPH oxidasa se asocia con el grosor íntima-media carotídeo en sujetos sin enfermedad aterosclerótica clínica***

*NADPH oxidase-dependent superoxide production is associated with carotid intima-media thickness in subjects free of clinical atherosclerotic disease*

**Zalba G, Beloqui O, San José G, Moreno MU, Fortuño A y Díez J**

***Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:1452-7.***

**Objetivo.** El estrés oxidativo desempeña un papel crítico en la patogénesis de la aterosclerosis. La NADPH oxidasa constituye la principal fuente de aniones superóxido en células vasculares y fagocíticas. El presente estudio tuvo como objetivo investigar la producción de superóxido procedente de la NADPH oxidasa de células fagocíticas, así como la asociación entre dicha producción fagocítica de superóxido y el grosor íntima-media carotídeo (GIM), utilizado como un marcador secundario de aterosclerosis asintomática.

**Métodos y resultados.** La producción de superóxido procedente de la NADPH oxidasa de células fagocíticas se determinó por quimioluminiscencia usando lucigenina en 184 pacientes sin síntomas de enfermedad aterosclerótica. Los individuos del tercil superior de aniones superóxido (> 20 cuentas/s) presentaron un GIM significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que los del tercil inferior. Los análisis de correlación mostraron una relación positiva ( $p < 0,05$ ) con el índice de masa corporal. El análisis multivariante demostró que la asociación de producción de superóxido con el GIM era también significativa después de ajustar por la edad, el sexo, la presión sistólica, el índice de masa corporal, los triglicéridos, la glucosa y el consumo de tabaco.

**Conclusiones.** En una población de adultos sin enfermedad aterosclerótica clínica, la actividad NADPH oxidasa de células fagocíticas se asoció a un aumento del GIM, lo que indica una relación entre el estrés oxidativo dependiente de la NADPH oxidasa fagocítica y el desarrollo de aterosclerosis.

#### **COMENTARIO**

*El estrés oxidativo se debe a un desequilibrio entre la producción y la neutralización de las especies reactivas de oxígeno por las enzimas antioxidantes, que da lugar a un exceso neto de las especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo desempeña un papel central en las alteraciones asociadas al desarrollo, la progresión y las complicaciones de la enfermedad aterosclerótica. Participa en el desarrollo de la disfunción endotelial (debido a la capacidad de los aniones superóxido para combinarse con el óxido nítrico y formar peroxinitrito), el remodelado vascular (estimula el*

*crecimiento, la migración y la apoptosis de células musculares lisas vasculares), el desarrollo de fibrosis, el proceso inflamatorio y la inestabilización de la lesión ateromatosa (por la activación de las metaloproteinasas). Además es bien conocido el papel de los aniones superóxido en el proceso de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que es determinante en el origen del proceso aterosclerótico. La principal fuente de producción de los aniones superóxido a nivel vascular es la NADPH oxidasa, que se halla presente en las células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos. Sin embargo, diversos estudios han propuesto que las isoformas no vasculares de la NADPH oxidasa, y en concreto aquella presente en monocitos, pueden contribuir de manera importante a las alteraciones oxidativas que ocurren durante el desarrollo aterosclerótico.*

*Siguiendo con esta línea de pensamiento, los autores del presente trabajo se propusieron profundizar en el estudio y relevancia de la NADPH oxidasa monocítica en el desarrollo aterosclerótico. La hipótesis del presente estudio fue la existencia de una asociación entre la NADPH oxidasa monocítica y el desarrollo de aterosclerosis en individuos sin síntomas clínicos de enfermedad vascular. Para ello estudiaron la producción de aniones superóxido por células fagocíticas periféricas (monocitos y linfocitos) y el GIM en individuos aparentemente sanos, sin historia de enfermedad aterosclerótica. Para llevar a cabo el estudio, se analizó a 184 individuos (que acudían a la Clínica Universitaria de Navarra para control de riesgo cardiovascular), de los que el 81% eran varones, con una edad media de 53,9 años, y que no presentaban síntomas clínicos de enfermedad aterosclerótica. Se dividió a los individuos participantes en el estudio en terciles de acuerdo con la producción de aniones superóxido de origen fagocítico. Los individuos en el tercil superior presentaban un GIM aumentado con respecto a los de terciles bajo y medio. Se encontró una correlación bivariable positiva entre producción de superóxido y GIM en todos los sujetos. Esta asociación entre ambas variables se mantuvo después de realizar una corrección por posibles factores de confusión. Además, los sujetos en el tercil más alto de producción de aniones superóxido también presentaron cifras de presión arterial sistólica (PAS), índice de masa corporal, glucemia basal y concentración plasmática de triglicéridos más elevados que aquellos del tercil inferior. La producción de aniones superóxido fagocíticos se asoció significativamente con la concentración de triglicéridos y el índice de masa corporal. El GIM se correlacionó también con la edad, la PAS, el índice de masa corporal, la glucemia basal y la concentración plasmática de triglicéridos. En los últimos años, son numerosos los estudios que han resaltado la importancia de la NADPH oxidasa de origen vascular como principal fuente de estrés oxidativo en el desarrollo de aterosclerosis. Sin embargo, el presente estudio resalta la importancia de la NADPH oxidasa fagocítica en este proceso, por lo que se podría postular que ambas isoformas participan en la progresión aterosclerótica. Esta propuesta se basa en que, según los resultados del estudio, la producción de aniones superóxido fagocítica explica hasta el 14,3% de la variación del GIM (después de ajustar por los factores de riesgo comunes). Por lo que*

*cabe suponer que las isoformas vasculares también participen de manera importante. Además, otras fuentes de producción de aniones superóxido, como la xantina oxidasa, la lipooxigenasa y la óxido nítrico sintasa, también se deben considerar en la contribución a la producción total de superóxido y al aumento del GIM carotídeo. Aunque, como aspecto novedoso, las conclusiones del estudio se basan en la potencial importancia de la NADPH oxidasa de origen fagocítico en el aumento del GIM carotídeo, la falta de biopsias de los individuos estudiados impide averiguar con certeza qué isoformas de la NADPH oxidasa están involucradas en realidad en el aumento del GIM carotídeo. En resumen, la asociación observada entre la producción fagocítica de aniones superóxido y el GIM indica que el estrés oxidativo de este origen podría participar en el desarrollo del proceso aterosclerótico.*

### Vicente Lahera

#### Bibliografía recomendada

- Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci.* 2003;28:502-8.
- Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:23-8.
- Fortuño A, Oliván S, Beloqui O, San José G, Moreno MU, Díez J, et al. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide production in essential hypertension. *J Hypertens.* 2004;22:2169-75.
- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 2000;86:E85-90.
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2003;91(3A):7-11.
- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003;42:1075-81.

## **La expresión endógena de la proteína C reactiva está incrementada en placas activas (ulceradas no complicadas) de arteria carótida humana**

*Endogenous expression of c-reactive protein is increased in active (ulcerated noncomplicated) human carotid artery plaques*

**Krupinski J, Miguel Turu M, Martínez-González J, Carvajal A, Juan-Babot JO, Iborra E, Slevin M, Rubio F y Badimon L**

**Stroke.** 2006;37:1200-4.

*Antecedentes y propósito.* Hay evidencias que indican que la proteína C reactiva (PCR) es una molécula efectora capaz de inducir y promover la aterosclerosis. La presencia de PCR en las placas ateroscleróticas puede reflejar bien su producción local o infiltración de la PCR circulan-

te, que está incrementada en la respuesta inflamatoria general. El objetivo fue analizar la PCR en placas de ateroma carotídeas humanas con diferentes características anatomopatológicas, y detectar la expresión local de PCR y otros genes proinflamatorios en estas lesiones.

*Métodos.* Las muestras, procedentes de 38 pacientes que fueron sometidos a una endarterectomía carotídea, se clasificaron en 3 grupos: ulceradas no complicadas (UNC; n = 19), ulceradas complicadas/hemorragicas (UC; n = 7) y fibrosas (F; n = 12). La PCR se evaluó por inmunohistoquímica, y se determinó la concentración de PCR ultrasensible en muestras plasmáticas. Para el estudio de los genes inflamatorios (PCR, interleucina 6 [IL-6], factor estimulante de colonias de macrófagos-1, proteína quimiotáctica de monolitos-1 y ciclooxigenasa-2) se utilizaron TaqMan Low-density Arrays.

*Resultados.* El ARNm de la PCR se detectó principalmente en placas UNC de alto riesgo, pero no en placas UC (p = 0,001). Las placas UNC también presentaron las mayores expresiones de otros genes inflamatorios: ciclooxigenasa-2 (p < 0,005 comparado con F y con UC), IL-6 (p < 0,005 frente a F y frente a UC) y proteína quimiotáctica de monocitos-1 (p < 0,001 frente a F y frente a UC). Las concentraciones de ARNm de PCR se correlacionaron con los análisis inmunohistoquímicos, pero fueron independientes de las concentraciones plasmáticas de PCR ultrasensible. En las placas UNC, las células endoteliales e inflamatorias fueron altamente positivas para PCR alrededor de las áreas de nueva formación de microvasos.

*Conclusiones.* En placas humanas carotídeas de alto riesgo (UNC), la expresión de PCR refleja un estado proinflamatorio activo. La síntesis local de PCR podría estar involucrada en la neovascularización de la placa y en un riesgo aumentado de hemorragia.

### COMENTARIO

*El proceso inflamatorio desempeña un papel crucial en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis. La inflamación crónica local y sistémica está además relacionada con las complicaciones trombóticas de la aterosclerosis. Por ello, desde hace años, son muchos los estudios que han demostrado que los marcadores inflamatorios en general, y en concreto la proteína C reactiva (PCR), son buenos predictores de eventos cardiovasculares futuros. Sin embargo, es importante resaltar que no se debe considerar la PCR como un simple marcador de inflamación en aterosclerosis, sino como un agente que participa activamente en las alteraciones vasculares asociadas a la progresión y complicación de la lesión aterosclerótica. Se ha demostrado que la PCR tiene actividad quimiotáctica para monolitos circulantes, estimula la expresión vascular de moléculas de adhesión y del activador de plasminógeno tisular tipo 1 (PAI-1), reduce la expresión del óxido nítrico (NO), e incluso aumenta la expresión de las metaloproteinasas, con lo que contribuye a la inestabilidad de la placa de ateroma. Aunque tradicionalmente se ha considerado el origen hepático de la PCR, más recientemente se ha demostrado su síntesis en macrófagos, linfocitos y células musculares vasculares,*

por lo que se ha sugerido que la PCR presente en la pared vascular podría no ser un mero depósito o infiltrado de la PCR circulante, sino resultado de su síntesis local.

Para avanzar en el conocimiento del papel de la PCR vascular y su posible participación en las complicaciones ateroscleróticas, los autores de este artículo se propusieron estudiar la presencia de PCR en lesiones ateroscleróticas carotídeas humanas, evaluando su expresión génica y la de otros genes inflamatorios. Se estudió a 38 pacientes que habían sido sometidos a una endarterectomía carotídea debido a una estenosis mayor del 70%. Se clasificó a los pacientes en 3 grupos de acuerdo a las características de sus placas en: ulceradas no complicadas (UNC), ulceradas complicadas (UC) y fibrosas (F). En los 3 grupos estudiados no se observaron diferencias en el grado de la enfermedad carotídea sintomática, factores de riesgo cardiovascular, parámetros bioquímicos básicos o coexistencia de otra enfermedad vascular. Los pacientes con UNC presentaron afeción carotídea unilateral de manera predominante.

Uno de los aspectos que clarifica este artículo es que la presencia de PCR en las lesiones ateroscleróticas se creía debido a una deposición de la proteína circulante. En estudios previos se había propuesto esta posibilidad, ya que las evidencias de la producción local de PCR en lesiones ateroscleróticas muy avanzadas eran muy limitadas.

El principal resultado de este estudio es que las placas ulceradas sin complicación, es decir el grupo UNC, presentaban un aumento de la expresión de los genes de factores inflamatorios (PCR, COX-2, IL-6, MCP-1) en comparación con las placas UC y las F. En dichas placas la PCR se localizó principalmente en la neointima, donde predominaban células inflamatorias y microvasos. Es importante destacar que la expresión elevada de PCR en las placas UNC era independiente de los factores de riesgo cardiovascular. Este aspecto parece relevante, puesto que tradicionalmente se ha pensado que cuanto mayor sea el riesgo cardiovascular, mayor podría ser la evolución de las lesiones carotídeas y por tanto un mayor riesgo de complicación. Sin embargo, es en las placas no complicadas donde los factores inflamatorios están más elevados. Podría ser que ciertas placas ulceradas tuvieran una actividad inflamatoria previa a la complicación que las hiciese más vulnerables, y las placas que ya se han complicado tuviesen una menor actividad inflamatoria. Estos resultados, a su vez, indican una secuencia de eventos conocidos y que corroboran una posible vía de complicación de las placas ateroscleróticas. En las placas UNC, además de la PCR, se encuentra un aumento de la expresión de IL-6 y de MCP-1. La IL-6 es el principal inductor de la PCR, y la PCR incrementa la expresión de MCP-1, que a su vez actuaría como agente de reclutamiento de más células inflamatorias. Esta secuencia indica un proceso automantenido que tendería a elevar la actividad inflamatoria de las lesiones, como lo demuestra el hecho de que las lesiones con una mayor expresión de PCR presentan también un aumento del número de células inflamatorias. Por otro lado, hay que recordar que la PCR y otros agentes inflamatorios estimulan la producción de metaloproteinasas por células inflamatorias, que son causantes del aumento de vulnera-

bilidad de la lesión y la hacen más proclive a su complicación trombótica.

Un aspecto novedoso, y menos conocido que reafirma este artículo, es el papel de la PCR en la angiogénesis de la lesión aterosclerótica avanzada. El hecho de que las placas no complicadas presenten un aumento de la vascularización intraplaca indica que la PCR procedente de las células endoteliales, musculares lisas e inflamatorias podría ser un agente angiogénico que promoviese la formación de nuevos vasos en el interior de la placa y con ello aumentase el riesgo subsiguiente de hemorragias dentro de la lesión.

En resumen, los resultados del presente estudio indican que la presencia de inflamación está ligada a una situación activa previa a la complicación. Sin embargo, en el presente estudio no se encuentra una correlación entre la expresión local de PCR en las lesiones y las concentraciones circulantes de dicho marcador inflamatorio. Por ello, los resultados apoyan el concepto de que, independientemente de las concentraciones plasmáticas de PCR, es un aumento local de PCR y otros agentes inflamatorios el elemento causante del aumento de la vulnerabilidad de la lesión aterosclerótica, que la hace más susceptible de complicación trombótica.

**Vicente Lahera**

#### Bibliografía recomendada

- Benbir G, Bozluolcay M, Ince B. Is the level of C-reactive protein correlated with the extent of carotid atherosclerosis? *Acta Neurol Belg.* 2005;105:73-80.
- Inoue T, Kato T, Uchida T, Sakuma M, Nakajima A, Shibazaki M, et al. Local release of C-reactive protein from vulnerable plaque or coronary arterial wall injured by stenting. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46:239-45.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-74.
- Paul A, Yeh ET, Chan L. A proatherogenic role for C-reactive protein in vivo. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16:512-7.
- Vainas T, Stassen FR, De Graaf R, Twiss EL, Herrgreen SB, Welten RJ, et al. C-reactive protein in peripheral arterial disease: relation to severity of the disease and to future cardiovascular events. *J Vasc Surg.* 2005;42:243-51.

### **Tejido adiposo perivascular y función vascular mesentérica en ratas espontáneamente hipertensas**

*Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats*

**Gálvez B, De Castro J, Herold D, Dubrovskaya G, Arribas S, González MC, Aranguéz I, Luft FC, Ramos MP, Gollasch M y Fernández Alfonso MS**

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1297-302.

**Objetivo.** El tejido adiposo perivascular de ratas normotensas libera un factor transferible que induce relajación a través de la apertura de canales de potasio dependien-

tes de voltaje ( $K_v$ ). La relevancia de estas observaciones en hipertensión es desconocida.

**Métodos y resultados.** Se caracterizó el tejido adiposo mesentérico de ratas espontáneamente (SHR) y Wistar Kioto (WKY, control normotenso) de 3 meses de edad. Las ratas SHR presentan una menor cantidad de tejido adiposo mesentérico, un menor contenido de lípidos totales, y adipocitos mesentéricos más pequeños que los WKY. Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, glicerol, ácidos grasos libres y colesterol fueron también significativamente menores en las ratas hipertensas. Además, las concentraciones plasmáticas y mesentéricas de leptina se correlacionaron con la cantidad de tejido adiposo mesentérico. Para el estudio de la función vascular, se canuló el lecho vascular mesentérico y se perfundió a un flujo constante de 2 ml/min. El bloqueante de los canales de potasio dependientes de voltaje, la 4-aminopiridina (4-AP; 2 mmol/l), produjo un incremento de la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico menor en SHR que en WKY, que es proporcional a la cantidad de tejido adiposo mesentérico. En segmentos aislados de arteria mesentérica, la 4-AP produjo también un menor incremento de la presión de perfusión en la cepa SHR. El efecto anticontráctil de la grasa perivascular está reducido en segmentos de arteria mesentérica de SHR.

**Conclusiones.** Las diferencias en la cantidad y función del tejido adiposo perivascular mesentérico podrían contribuir al incremento de las resistencias vasculares observadas en SHR.

## COMENTARIO

*El estudio de la regulación del tono vascular se ha basado tradicionalmente en el estudio de los mecanismos y factores que afectan a la función y la estructura de las 3 capas diferentes que constituyen los vasos sanguíneos: íntima, media y adventicia. Debido a que muchos vasos sanguíneos están rodeados de tejido adiposo, en los últimos años, está cobrando interés el estudio del posible papel del tejido adiposo perivascular en la regulación de la función vascular. Actualmente, el tejido adiposo ha dejado de considerarse un mero depósito de energía, y se considera un auténtico órgano secretor, con acciones autocrinas, paracrinas y sistémicas. Recientes estudios en animales normotensos han demostrado que el tejido adiposo perivascular libera un factor difusible conocido como factor relajante derivado de los adipocitos (ADRF). El ADRF se libera de los adipocitos perivascuales por un mecanismo que es dependiente de calcio y de AMPc. Este factor atenúa la acción de los factores constrictores mediante un efecto relajante mediado por la activación de canales de potasio dependientes de voltaje, en arterias mesentéricas, y de canales de potasio dependientes de ATP, en arterias de mayor tamaño como la aorta. Este efecto anticontráctil del ADRF es dependiente de la cantidad de tejido adiposo perivascular e independiente de la presencia de endotelio. Por ello, los resultados disponibles hasta el momento apoyan el concepto de la participación del tejido adiposo perivascular en la regulación del tono vasomotor.*

*El presente trabajo demuestra que las ratas espontáneamente hipertensas tienen una menor cantidad de tejido adiposo (perivascular mesentérico y lumbar) que las ratas normotensas de iguales edad y peso. Asimismo, los adipocitos de las ratas hipertensas son más pequeños y tienen un menor contenido de lípidos totales que los animales normotensos. Es interesante destacar que las ratas hipertensas presentan concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres y glicerol inferiores que las normotensas. Además, tanto la concentración plasmática de leptina como la leptina mesentérica fueron menores en las ratas hipertensas que en las normotensas.*

*Por otro lado, el hecho de que el bloqueante de los canales de potasio dependientes de voltaje, la 4-aminopiridina, induzca un incremento de la presión de perfusión basal del lecho mesentérico y aumente la respuesta contráctil a serotonina en anillos de arteria mesentérica demuestra que el efecto anticontráctil del tejido adiposo perivascular mesentérico está mediado a través de los canales de potasio dependientes de voltaje. Además, en anillos de arteria mesentérica con la misma cantidad de tejido adiposo perivascular, la 4-aminopiridina indujo una mayor respuesta constrictora en ratas normotensas que en hipertensas. Es importante destacar que las diferencias en la respuesta a 4-aminopiridina pueden ser atribuidas a un efecto anticontráctil del tejido adiposo perivascular, puesto que no son debidas a una diferencia en la sensibilidad a la hiperpolarización de la membrana de las células de músculo liso vascular, a un efecto mecánico producido por la diferente cantidad de tejido adiposo mesentérico, ni a una diferente respuesta relajante dependiente de endotelio.*

*En resumen, el presente estudio apoya los resultados previamente publicados de que el tejido adiposo perivascular participa en la regulación del tono vasomotor. Los resultados indican que una menor cantidad de tejido adiposo perivascular facilita la respuesta contráctil de las arterias mesentéricas, y apoya la hipótesis de que el aumento de resistencias periféricas que se asocia a la hipertensión podría ser debido en parte a una alteración de la regulación paracrina del tono vasomotor por parte del tejido adiposo perivascular, a través de canales de potasio dependientes de voltaje.*

## Vicente Lahera

### Bibliografía recomendada

- Dubrovskaya G, Verlohren S, Luft FC, Gollasch M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol.* 2004;286:H1107-13.
- Fernández-Alfonso MS. Regulation of vascular tone: the fat connection. *Hypertension.* 2004;44:255-6.
- Gollasch M, Dubrovskaya G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25:647-53.
- Löhn M, Dubrovskaya G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J.* 2002;16:1057-63.
- Verlohren S, Dubrovskaya G, Tsang S-Y, Essine K, Luft FC, Huang Y, et al. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension.* 2004;44:271-6.