

los leucocitos a través de la capa endotelial hasta la íntima, en un proceso gobernado por la MCP-1 y otras quimiocinas, que promueven la selección de monocitos y linfocitos T. En este proceso inflamatorio, el TNF- α y la IL-1 también desempeñan un papel clave, ya que estimulan la expresión de moléculas de adhesión (molécula de adhesión vascular tipo 1, P-selectina, E-selectina y molécula de adhesión intercelular tipo 1) por parte de los leucocitos, favoreciendo así la interacción célula-célula que contribuye enormemente al inicio de la aterosclerosis. Se ha demostrado que la vía de las JNK es requerida para la inducción de las moléculas de adhesión por parte del TNF- α ⁸, regulando al mismo tiempo la selección de monocitos y linfocitos T⁹. Por otro lado, la captación de lipoproteínas de baja densidad oxidadas por parte de macrófagos y células musculares lisas requiere la inducción de la expresión de receptores, como SR-A o CD36 por parte de JNK2⁸, y así se contribuye a la formación de células espumosas y se facilita el transporte reverso de colesterol, uno de los procesos centrales en el proceso antiaterogénico. Igualmente, la isoforma JNK1 es requerida específicamente para la biosíntesis de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) inducida por lipopolisacáridos en macrófagos. La actividad JNK también es importante en estadios avanzados de la formación de la placa, pues interviene en el incremento de expresión de diversas metaloproteinasas de matriz⁸. Esto indica que las JNK desempeñan un papel en el proceso de ruptura de las lesiones ateroscleróticas. Finalmente, la diferenciación de linfocitos CD4 Thelper (Th) a células Th1 y Th2 efectoras es también mediada por las vías de señalización JNK2 y JNK1, respectivamente⁸. Hay estudios que demuestran que otra TZD, la pioglitazona, reduce la hiperplasia de la neointima que se produce durante la aterosclerosis y, por lo tanto, podría ser útil para el tratamiento de la aterosclerosis. Este efecto podría ser consecuencia, al menos en parte, de la inhibición de la actividad JNK. Además de los efectos potencialmente beneficiosos en la formación de la placa de ateroma que tendría la inhibición de la actividad JNK, las TZD presentan otros efectos adicionales, como son la inhibición de la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B o la mejora del perfil lipídico en pacientes tratados. No obstante, aún no está claro si la inhibición inespecífica de los diferentes subtipos de JNK podría resultar beneficiosa o, por el contrario, sería preferible la inhibición específica de cada isoforma por separado. En este segundo caso, se minimizarían los efectos secundarios no deseados, y debidos al amplio espectro de expresión y acción que tienen las JNK. Aunque Díaz-Delfín et al indican la implicación de la isoforma JNK1, no debe descartarse un papel para las otras isoformas, especialmente JNK2, que también se expresa de manera ubicua. Los autores demuestran *in vitro* que la reducción de la actividad JNK no es exclusiva de compuesto (rosiglitazona), ni de clase (TZD), pues tanto la troglitazona, como otros ligandos agonistas de PPAR γ , químicamente no relacionados con las TZD, presentan un efecto similar. Por ello, sería interesante determinar si el efecto de la rosiglitazona, la troglitazona y los otros agonistas de PPAR γ en la actividad JNK,

demostrado *in vitro* e *in vivo* en este estudio, también se produce en el endotelio vascular y en los macrófagos. Puesto que la conservación elevada de dominios estructurales dificulta el desarrollo de compuestos con selectividad específica para las distintas isoformas de JNK, se podría determinar si los distintos agonistas de PPAR γ que reducen la actividad JNK actúan de manera selectiva en estas isoformas.

Xavier Palomer

Bibliografía

1. Bennett BL, Satoh Y, Lewis AJ. JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:420-5.
2. Tuncman G, Hirosumi J, Solinas G, Chang L, Karin M, Hotamisligil GS. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:10741-6.
3. Steinberg GR, Michell BJ, Van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab*. 2006;4:465-74.
4. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420:333-6.
5. Waetzig V, Herdegen T. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26:455-61.
6. Squadrito F, Minutoli L, Esposito M, Bitto A, Marini H, Seminara P, et al. Lipid peroxidation triggers both c-Jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK) activation and neointimal hyperplasia induced by cessation of blood flow in the mouse carotid artery. *Atherosclerosis*. 2005;178:295-302.
7. Ricci R, Sumara G, Sumara I, Rozenberg I, Kurrer M, Akhmedov A, et al. Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science*. 2004;306:1558-61.
8. Sumara G, Belwal M, Ricci R. "Jnking" atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2487-94.
9. Li YS, Shyy JY, Li S, Lee J, Su B, Karin M, et al. The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression. *Mol Cell Biol*. 1996;16:5947-54.

Inhibición de la lisil-oxidasa (LOX) por parte del TNF- α : un nuevo mecanismo de disfunción endotelial inducido por el TNF- α

Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNF- α : A new mechanism underlying TNF- α -induced endothelial dysfunction

Rodríguez C, Alcludia JF, Martínez-González J, Raposo B, Navarro MA y Badimon L

Atherosclerosis. 2008;196:558-64. doi:10-1016/j.atherosclerosis.2007.06.002

Objetivo. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina proinflamatoria que induce disfunción endotelial y promueve la progresión de la aterosclerosis.

La inhibición de la lisil-oxidas (LOX), una enzima clave en la maduración de la matriz extracelular, por parte de los factores de riesgo proaterogénicos, como son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la homocisteína, está asociada con una alteración de la función del endotelio como barrera. Nuestra hipótesis se basa en que el TNF- α podría también modular la expresión/función de LOX en células endoteliales.

Métodos. Este estudio se llevó a cabo en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), células endoteliales de arteria porcina (PAEC) y células endoteliales de arteria bovina (BAEC). Los valores de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de LOX se analizaron por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, y la actividad LOX se cuantificó mediante un ensayo fluorescente de sensibilidad elevada. La actividad del promotor se determinó por medio de transfección transitoria, y se usó el sistema de la luciferasa como indicador.

Resultados. El TNF- α reduce los valores de ARNm de LOX en células endoteliales de manera dependiente de la dosis y del tiempo. El efecto de TNF- α se observó a bajas concentraciones (0,1-1 ng/ml) y fue máxima a dosis de 2,5 ng/ml (después de 21 h). Mediante ensayos de transfección, el TNF- α redujo la actividad transcripcional del promotor de LOX de manera similar a su ARNm. Además, el TNF- α redujo la actividad enzimática de LOX en células endoteliales. El uso de agonistas del receptor del TNF (TNFR) o anticuerpos bloqueadores, demostró la implicación de TNFR2 en la disminución de LOX. Mientras que el factor 2 asociado a TNFR (TRAF-2) se demostró que no intervenía en los episodios que provocaban una inhibición de LOX, los inhibidores de la proteína cinasa C (PCC) sí contrarrestaron la acción del TNF- α en la expresión de LOX. La administración de TNF- α también redujo significativamente la expresión vascular de LOX en aorta de rata.

Conclusiones. La disfunción endotelial inducida por el TNF- α está asociada con una reducción de la expresión y la actividad de LOX. Así pues, la LOX parece estar implicada en la alteración de la función endotelial estimulada por distintas condiciones patológicas.

COMENTARIO

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) contribuye en gran medida al desarrollo de la disfunción endotelial asociada al proceso aterosclerótico, pues reduce la disponibilidad de óxido nítrico e incrementa la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias y de otras citocinas proinflamatorias. En el presente estudio, Rodríguez et al demuestran que TNF- α , por medio de su unión al receptor del TNF 2 (TNFR2), inhibe la expresión y la actividad de la enzima lisil-oxidas (LOX) in vitro e in vivo. La LOX es una deaminasa dependiente de cobre que cataliza la formación de enlaces covalentes entre residuos lisina de moléculas vecinas, y es esencial para la maduración de la matriz extracelular. El número de enlaces covalentes existentes entre las moléculas paralelas de colágeno con-

diciona la resistencia a la tracción de las fibrillas, determina la integridad y la funcionalidad de la matriz extracelular y también condiciona, en gran medida, las propiedades biomecánicas de la pared del vaso. Más recientemente se han identificado nuevas funciones intracelulares para la LOX, como son la supresión del oncogén ras, la estimulación de la actividad del promotor del colágeno de tipo III, o la modulación de la adhesión y el crecimiento celular¹.

Un número creciente de publicaciones ha propuesto un papel para la LOX en el desarrollo de la disfunción endotelial, pues la inhibición de su actividad provoca el desarrollo de alteraciones graves en la estructura de los tejidos conjuntivos¹. De hecho, en el estudio que nos ocupa, se demuestra que la reducción de la LOX mediada por el TNF- α se correlaciona con una fuerte inducción de la expresión de la molécula de adhesión vascular tipo 1 en células endoteliales, e indica una alteración de la función de éstas. Rodríguez et al han analizado el papel potencial que tienen las vías de transducción de la proteína cinasa C (PCC), el NF- κ B y la cinasa c-Jun NH₂-terminal (JNK) en la LOX, ya que estas vías están implicadas en muchas de las alteraciones que el TNF- α provoca en la homeostasis de las células endoteliales. El uso de distintos inhibidores selectivos demuestra que sólo la PCC está implicada en la inhibición de la LOX. La PCC es una serina/treonina cinasa expresada de manera ubicua que está implicada en procesos de proliferación, supervivencia y apoptosis celular, y de la cual existen hasta 12 isoformas distintas. La activación de la PCC en células endoteliales de aorta incrementa la expresión de la ciclooxigenasa, reduce la producción de prostaciclina vasodilatadora, e incrementa la producción de tromboxano A2 vasoconstrictor². Asimismo, la PCC puede provocar resistencia a la insulina por fosforilación del receptor de insulina y el sustrato del receptor de insulina tipo 1, alterando la señalización de esta hormona. La insulina estimula la producción de óxido nítrico (NO) en el endotelio y, por tanto, la reducción de la disponibilidad de NO por alteración de la vía de señalización de la insulina provoca disfunción endotelial. La PCC también puede activar indirectamente el NF- κ B, factor de transcripción nuclear con actividad proinflamatoria y proapoptótica. No obstante, este trabajo demuestra que la inducción de la LOX por parte del TNF- α es independiente del efecto proapoptótico de este último. Por otro lado, un estudio realizado con neutrófilos ha demostrado que la PCC puede activar por fosforilación directa la actividad de la coenzima nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, un complejo enzimático que cataliza la reducción de oxígeno a anión superóxido y puede, en consecuencia, incrementar el estrés oxidativo³. En células endoteliales, la estimulación de la NADPH oxidasa mediada por el TNF- α , y la posterior producción de ROS, dependen de la activación de PCC- ζ , que es la isoforma más abundante en estas células⁴. En consecuencia, es posible que en las células endoteliales utilizadas en el estudio de Rodríguez et al, TNF- α incrementase la producción de especies reactivas de oxígeno dependiente de la vía PCC/NADPH oxidasa. No obstante, estos autores postulan las isoformas PCC- α y

PCC- β como las principales causantes de la disminución de LOX, e indican que ambos procesos presentan mecanismos de regulación diferentes. Probablemente, será necesaria la sobreexpresión de las distintas isoformas de PCC por separado en estas células para conocer mejor la implicación de cada una de ellas.

Estudios previos ya han demostrado una conexión entre la LOX y otros factores de riesgo proaterogénicos relacionados con la alteración de la función endotelial, como son la hipercolesterolemia, la hiperhomocisteinemia y la diabetes mellitus. Por ejemplo, valores plasmáticos elevados de homocisteína disminuyeron la expresión de LOX en células endoteliales vasculares⁵. Igualmente, la expresión de LOX en células endoteliales porcinas se redujo como consecuencia de valores elevados de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL)⁶, incrementando de esta manera la permeabilidad endotelial y la susceptibilidad de la placa de ateroma a la ruptura. La lesión primaria en la aterosclerosis consiste en la acumulación lipídica en la lámina íntima y la formación de células espumosas por medio de la captación de LDL modificadas, incluidas LDL oxidadas (LDLox), por parte de macrófagos. El incremento de LDLox induce la expresión de moléculas de adhesión y la consiguiente unión de los leucocitos al endotelio. El hecho de que este proceso pueda prevenirse parcialmente mediante la adición de inhibidores de la PCC no hace sino confirmar el papel importante que tiene esta cinasa en el desarrollo de la disfunción endotelial.

En resumen, los resultados aquí descritos indican que los fármacos que permitan modular la hiperactivación de la PCC en células endoteliales podrían ser efectivos para la prevención o el tratamiento de la aterosclerosis. Este estudio resalta el papel importante que lleva a cabo la LOX como preservante de la función endotelial, e indica que ésta podría ser también una diana terapéutica potencialmente útil para el tratamiento de la aterosclerosis. No obstante, debe tenerse en cuenta que hay otras 4 proteínas similares y relacionadas con LOX, como son las conocidas como LOXL(1-4). Aunque todavía se desconoce si las distintas LOXL se expresan en células endoteliales y cuáles son sus sustratos o funciones específicas in vivo, hay la posibilidad de efectos compensatorios entre ellas por redundancia de función. En este caso, sería importante estudiar el comportamiento de las LOXL en situaciones en las cuales la expresión, y sobre todo la actividad LOX, se encuentran reducidas. Por otro lado, hay también un estudio, realizado en conejos alimentados con una dieta aterogénica rica en colesterol, en el que se observó un incremento de actividad LOX en regiones específicas⁷. Estas regiones donde se producía un incremento de LOX correlacionaban con la distribución y la gravedad de las lesiones aórticas, aunque se indicó que este aumento de actividad podría ser un efecto compensatorio como consecuencia de la lesión vascular¹. Sea como fuere, son necesarios nuevos estudios para clarificar el papel de la LOX en relación con la placa de ateroma y su integridad posterior.

Xavier Palomer

Bibliografía

1. Bank RA, Van Hinsbergh VW. Lysyl oxidase: new looks on LOX. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1365-6.
2. Rask-Madsen C, King GL. Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:487-96.
3. Koike N, Takamura T, Kaneko S. Induction of reactive oxygen species from isolated rat glomeruli by protein kinase C activation and TNF-alpha stimulation, and effects of a phosphodiesterase inhibitor. *Life Sci.* 2007;80:1721-8.
4. Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB. PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res.* 2002;90:1012-9.
5. Raposo B, Rodríguez C, Martínez-González J, Badimon L. High levels of homocysteine inhibit lysyl oxidase (LOX) and downregulate LOX expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2004;177:1-8.
6. Rodríguez C, Raposo B, Martínez-González J, Casani L, Badimon L. Low density lipoproteins downregulate lysyl oxidase in vascular endothelial cells and the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1409-14.
7. Kagan HM, Raghavan J, Hollander W. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arteriosclerosis.* 1981;1:287-91.

Generación de un modelo de hipertensión genético mediante la interacción de la hipoalfalipoproteinemia y la hiperhomocisteinemia leves

Genetically based hypertension generated through interaction of mild hypoalphalipoproteinemia and mild hyperhomocysteinemia

Carnicer R, Navarro MA, Arbonés-Mainar JA, Arnal C, Surra JC, Acín S, Sarría A, Blanco-Vaca F, Maeda N y Osada J

***J Hypertens.* 2007;25:1597-607.**

Introducción. La hiperhomocisteinemia y la hipoalfalipoproteinemia son 2 factores de riesgo conocidos para la enfermedad cardiovascular. Los efectos de la combinación sinérgica de estos 2 factores en la función vascular necesitan investigarse.

Métodos y resultados. Se utilizaron 4 grupos de ratones macho: un grupo control; un grupo de ratones heterocigotos deficientes en cistationina β -sintasa (hetCBS); un grupo de ratones heterocigotos deficientes en apolipoproteína (apo) A-I (hetA-I) y, finalmente, un grupo de ratones doble-heterocigotos (doble-het) con ambas deficiencias combinadas. Para caracterizar el fenotipo resultante, se analizaron distintos parámetros, incluidos apolipoproteínas plasmáticas, perfil lipídico, homocisteína y presión sanguínea. Tal como se esperaba, nuestros resultados indican que los ratones doble-het son un buen modelo para la hipoalfalipoproteinemia y la hiperhomocisteinemia leves. La combinación aditiva de los 2 facto-