



CLÍNICA E INVESTIGACIÓN EN ARTERIOSCLEROSIS

www.elsevier.es/arterio



COMENTARIOS BIBLIOGRÁFICOS

La expresión del receptor de la interleucina-1 de tipo II disminuye en monocitos-macrófagos y en lesiones ateroscleróticas

Pou J, Martínez-González J, Rebollo A, Rodríguez C, Rodríguez-Calvo R, Martín-Fuentes P, Cenarro A, Civeira F, Laguna JC, Alegret M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2011;1811:556-63.

El receptor de la interleucina-1 de tipo II (IL-1R2) es un receptor de tipo señuelo que regula negativamente la actividad de la interleucina (IL)-1, una citocina proinflamatoria implicada en la aterogénesis. En este artículo se ha investigado la relevancia de IL-1R2 en la aterosclerosis por medio del estudio de su expresión en monocitos de pacientes hiperlipémicos, en macrófagos THP-1 expuestos a lipoproteínas, y en lesiones ateroscleróticas humanas. Nuestros resultados demuestran que la expresión del ARNm y la proteína de IL-1R2 se redujo en monocitos de pacientes con hiperlipemia familiar combinada (–30%, $p < 0,05$). Los macrófagos THP-1 incubados con concentraciones crecientes de lipoproteínas de baja densidad acetiladas (LDL-ac) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) también presentaban una reducción en los niveles de ARNm y proteína de IL-1R2. La preincubación con agentes que bloquean la acumulación intracelular de lípidos previno la reducción en la expresión de IL-1R2 provocado por estas lipoproteínas. Las lipoproteínas también evitaron el incremento de expresión de IL-1R1 e IL-1R2 provocado por la estimulación durante 4 h con lipopolisacárido (LPS), y redujeron los niveles de proteína total y fosforilada de la cinasa asociada al receptor de IL-1 de tipo 1. Finalmente, la expresión de IL-1R2 en vasos de pacientes humanos con aterosclerosis se encontraba marcadamente disminuida en comparación con arterias no ateroscleróticas (–80%, $p < 0,0005$). En conjunto, estos resultados sugieren que, en condiciones aterogénicas, la expresión de IL-1R2 se reduce en monocitos/macrófagos y en la pared vascular, hecho que podría facilitar la señalización de la IL-1.

Comentario

La existencia de un vínculo entre la presencia de inflamación y el desarrollo de la aterosclerosis fue descrita ya en el siglo XIX por Rudolf Virchow, cuando bautizó como *endarteritis deformans* a la enfermedad aterosclerótica. Actualmente está bien establecido que los procesos inflamatorios crónicos en la pared de las grandes arterias son uno de los principales agentes causales de esta patología. Dicho proceso ocurre en respuesta a la presencia de una disfunción endotelial, que provoca un incremento de la permeabilidad lipídica, aunque tiene lugar principalmente en la capa íntima arterial, donde se desarrolla la placa de ateroma. Uno de los fenómenos iniciales de la aterosclerosis es el reclutamiento de los monocitos circulantes al endotelio arterial mediante las moléculas de adhesión, y la posterior migración de estos hacia la capa íntima. Posteriormente, los monocitos reclutados se diferencian a macrófagos y comienzan a fagocitar lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en colesterol, convirtiéndose en células espumosas. Después de la lesión de la íntima, se produce un incremento de la expresión de receptores de tipo *toll-like* (TLR), implicados en la activación de la respuesta inflamatoria en los propios macrófagos, pues inducen la expresión de diversas citocinas como la IL-6, la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α .

La IL-1 es una citocina multifuncional secretada por monocitos y macrófagos de los vasos sanguíneos que desempeña un papel crucial en el proceso aterogénico. De hecho, tanto la IL-1 α como la IL-1 β facilitan la formación de la lesión aterosclerótica mediante la estimulación de la adhesión y la trans migración leucocitaria, además de favorecer la formación de la célula espumosa y de la estría grasa. Por ejemplo, se ha descrito que los ratones deficientes en IL-1 o en su receptor presentan una menor progresión de la aterosclerosis. La vía de señalización de la IL-1 depende de la unión de esta al receptor IL-1 de tipo I (IL-1R1), hecho que provoca el reclutamiento de la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RacP) y la posterior fosforilación por activación de la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK4). Las subsiguientes fosforilación y degradación proteosómica de IRAK1 e IRAK2 permitirán la interacción de este complejo con el factor asociado al receptor de TNF (TRAF)-6 y, finalmente, la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B. Esta vía de señalización puede ser inhibida por el receptor de IL-1 de tipo II (IL-1R2 o CD121b),

proteína con capacidad de unión tanto a IL-1 como a IL-1R1. IL-1R2 ejerce de receptor señuelo, pues actúa como sumidero de los ligandos de unión a IL-1R1 e inhibe la actividad de estos mediante dos mecanismos principales. En primer lugar, compite con IL-1R1 por la unión de IL-1 y, en segundo lugar, secuestra IL-1RacP e impide la unión de esta a IL-1R1. En este estudio de Pou et al. se demuestra que los niveles de proteína IL-1R2 se encuentran reducidos tanto en monocitos de pacientes con hiperlipemia familiar combinada, como en lesiones ateroscleróticas de arterias coronarias humanas. Este hecho concuerda con estudios previos de este mismo grupo en los que ya se demostró la reducción de la expresión del gen *IL-1R2* en monocitos de pacientes con hipercolesterolemia, en comparación con los sujetos control¹. En el trabajo aquí descrito también se han estudiado los mecanismos mediante los cuales la hiperlipemia provoca la reducción de la expresión de IL-1R2 en la línea celular monocítica humana THP-1. Resulta interesante observar como el tratamiento de estas células con concentraciones crecientes de LDL acetiladas reduce la expresión y la acumulación proteica de IL-1R2 e IL-1R1 de manera dependiente de la dosis. Por otro lado, el tratamiento con VLDL solo reducía los niveles de IL-1R2. Estos resultados sugerían que la disminución de IL-1R2 observada en monocitos de pacientes con hipercolesterolemia podría ser consecuencia de la progresiva acumulación de lípidos en estas células. Esto se demuestra de manera elegante en el estudio de Pou et al. por medio del pretratamiento de las células THP-1 con cloroquina y orlistat. El orlistat actúa inhibiendo la lipasa pancreática, una enzima responsable de hidrolizar los triglicéridos intestinales en ácidos grasos absorbibles, mientras que la cloroquina es un fármaco usado en el tratamiento o la prevención de la malaria que actúa como un inhibidor del procesamiento lisosomal. Los resultados muestran como ambos fármacos previnieron la disminución de la expresión de IL-1R2 inducida, respectivamente, por las LDL acetiladas y las VLDL. Finalmente, el tratamiento de células THP-1 con LPS, una conocida endotoxina que induce una respuesta inflamatoria potente por parte de los macrófagos, indujo un incremento de la expresión de IL-1R2. Con respecto a este último efecto del LPS existe alguna controversia, pues mientras algunos autores demuestran que este puede inhibir la expresión de IL-1R2 en monocitos humanos², otros indican que en neutrófilos de pacientes con sepsis la activa³. Este incremento de expresión de IL-1R2 inducido por LPS era parcialmente revertido en presencia de LDL acetiladas y VLDL, sugiriendo que estas lipoproteínas podrían facilitar el efecto proinflamatorio del propio LPS o incluso de la IL-1 mediante la hiperfosforilación de IRAK1.

Un aspecto interesante de este trabajo es el estudio de los mecanismos implicados en la disminución de IL-1R2 en la línea celular THP-1 diferenciada. En presencia de forbol 12-miristato 14-acetato (PMA), esta línea celular monocítica se diferencia a células con un fenotipo fagocítico similar al de los macrófagos. No obstante, el PMA es asimismo un potente activador de la proteína cinasa C y, por lo tanto, también lo puede ser de la vía de señalización proinflamatoria NF- κ B. De acuerdo con ello, existen trabajos que sugieren que el estudio de los procesos inflamatorios en células THP-1 solo 24 h después de diferenciar con PMA podría ser con-

traproducente. Por ejemplo, Qiu et al.⁴ muestran que los niveles de IL-1, IL-6 y TNF- α son aún elevados transcurridas 24 h después del tratamiento con PMA a 100 nM. Por esta razón, los efectos observados en presencia de VLDL y LDL acetiladas podrían verse potenciados de alguna manera por la presencia de una activación basal de la señalización de la vía IL-1. Además, es importante destacar que IL-1R2 es uno de los genes regulados a partir de la propia actividad de NF- κ B⁵. En este mismo sentido, cabe destacar que la cloroquina puede inducir la actividad de NF- κ B y la vía de señalización de la IL-1 en algunos tipos celulares⁶, hecho que podría explicar el incremento de la expresión de IL-1R2 en presencia de LDL acetiladas. A pesar de ello, también existen otros estudios que indican que la cloroquina, por el contrario, inhibe la producción de citocinas en células THP-1⁷. Por todo ello, sería necesario investigar el efecto que por sí solo hace este compuesto sobre la expresión de IL-1R2 en células THP-1, independientemente de la presencia de las LDL acetiladas. Asimismo, sería interesante investigar el efecto de la presencia de inhibidores de NF- κ B, con el fin de aislar los efectos derivados de la acumulación de lípidos en la célula, de aquellos otros derivados de la activación de NF- κ B y que son independientes de esta acumulación.

En conjunto, los resultados mostrados en este trabajo muestran un papel muy relevante en el desarrollo de la aterosclerosis en pacientes con hiperlipemia familiar combinada para la vía de señalización de la IL-1 y, más específicamente, para su receptor señuelo IL-1R2. Las conclusiones obtenidas vienen reforzadas por la utilización de distintos modelos y estímulos, haciendo patente la necesidad de realizar más estudios sobre este receptor, con el fin de determinar su relevancia clínica, así como la utilidad terapéutica que podría tener la modulación de los niveles de este receptor en dichos pacientes.

Bibliografía

1. Llaverias G, Pou J, Ros E, Zambon D, Cofan M, Sanchez A, et al. Monocyte gene-expression profile in men with familial combined hyperlipidemia and its modification by atorvastatin treatment. *Pharmacogenomics*. 2008;9:1035–54.
2. Penton-Rol G, Orlando S, Polentarutti N, Bernasconi S, Muzio M, Introna M, et al. Bacterial lipopolysaccharide causes rapid shedding, followed by inhibition of mRNA expression, of the IL-1 type II receptor, with concomitant up-regulation of the type I receptor and induction of incompletely spliced transcripts. *J Immunol*. 1999;162:2931–8.
3. Giri JG, Wells J, Dower SK, McCall CE, Guzman RN, Slack J, et al. Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. Potential role for type II receptor in regulation of IL-1 responses. *J Immunol*. 1994;153:5802–9.
4. Qiu G, Ho AC, Yu W, Hill JS. Suppression of endothelial or lipoprotein lipase in THP-1 macrophages attenuates proinflammatory cytokine secretion. *J Lipid Res*. 2007;48:385–94.
5. Baltathakis I, Alcantara O, Boldt DH. Expression of different NF-kappaB pathway genes in dendritic cells (DCs) or macrophages assessed by gene expression profiling. *J Cell Biochem*. 2001;83:281–90.
6. Park J, Kwon D, Choi C, Oh JW, Benveniste EN. Chloroquine induces activation of nuclear factor-kappaB and subsequent

expression of pro-inflammatory cytokines by human astroglial cells. *J Neurochem.* 2003;84:1266–74.

7. Sahingur SE, Xia XJ, Alamgir S, Honma K, Sharma A, Schenkein HA. DNA from *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* induce cytokine production in human monocytic cell lines. *Mol Oral Microbiol.* 2010;25:123–35.

Xavier Palomer

Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)

Correo electrónico: xpalomer@ub.edu

doi:10.1016/j.arteri.2012.01.001

CCL20 se encuentra incrementado en sujetos con hipercolesterolemia y aumenta en presencia de LDL en células vasculares de músculo liso

Calvayrac O, Rodríguez-Calvo R, Alonso J, Orbe J, Martín-Ventura JL, Guadall A, Gentile M, Juan-Babot O, Egido J, Belouqui O, Paramo JA, Rodríguez C, Martínez-González J. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2011;31:2733–41.

El objetivo de este estudio consistió en analizar la regulación del ligando de quimiocinas CC de tipo 20 (CCL20) por lipoproteínas de baja densidad (LDL) en células de musculatura lisa vascular humana (VSMC). En sujetos asintomáticos, los niveles circulantes de CCL20 eran superiores en los pacientes que presentaban hipercolesterolemia ($18,5 \pm 3,2$ versus $9,1 \pm 1,3$ pg/ml; $p < 0,01$). En células VSMC, LDL inducía la expresión de CCL20 de manera dependiente de la dosis y del tiempo. El incremento de los niveles de CCL20 secretados por células VSMC tratadas con LDL inducía de manera significativa la migración de linfocitos humanos, efecto que disminuía después de silenciar CCL20. Este incremento de CCL20 inducido por LDL dependía de la activación de vías de señalización de diversas cinasas y también de NF- κ B. Mediante mutagénesis dirigida, ensayos de cambio en la movilidad electroforética e inmunoprecipitación de cromatina hemos identificado un sitio en NF- κ B (-80/-71) en la región promotora de CCL20 que es crítico para la respuesta a LDL. El ácido lisofosfatídico mimetizaba el incremento de CCL20 inducido por LDL, y la oxidación mínima de LDL incrementaba la capacidad de esta para inducir CCL20 mediante mecanismos que implican los receptores del ácido lisofosfatídico. CCL20 se encontraba sobreexpresado en lesiones ateroscleróticas de pacientes con enfermedad coronaria arterial, co-localizando con VSMC. CCL20 también se detectó en medio condicionado de aorta de sujetos sanos, y sus niveles aumentaron en secretomas de especímenes procedentes de endarterectomía de carótida. En conclusión, este estudio identifica CCL20 en las lesiones ateroscleróticas y caracteriza esta quimiocina como un mediador altamente sensible a la respuesta inflamatoria inducida por LDL.

Comentario

La aterosclerosis es una enfermedad en cuya progresión subyace un proceso inflamatorio crónico, aunque en algunos casos la causa desencadenante —la disfunción endotelial—

presenta características propias de una inflamación aguda. En las zonas donde se produce esta disfunción endotelial aumenta la permeabilidad vascular, favoreciendo la infiltración de LDL hacia el espacio subendotelial de la pared vascular. Como consecuencia, en estas regiones se incrementa la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas atrayentes, que favorecen el reclutamiento de las células inflamatorias. Los monocitos que penetran la pared arterial son capaces de diferenciarse a macrófagos, un tipo celular que expresa receptores *scavenger* que les permiten captar las LDL oxidadas y enriquecerse de material lipídico. La acumulación de lípidos en estos macrófagos provocará la formación de las células espumosas, que son la base de la estria grasa típica de la lesión aterosclerótica. El factor de transcripción nuclear NF- κ B regula la expresión de muchos de los genes inflamatorios relacionados con este proceso aterogénico, incluyendo las moléculas de adhesión, las citocinas y las quimiocinas. La actividad de este factor de transcripción es inducida por múltiples estímulos, incluyendo las mismas citocinas proinflamatorias (por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α] y la interleucina [IL]-1) o las LDL oxidadas.

La implicación de las quimiocinas en el desarrollo de la aterosclerosis es cada vez más reconocida. Estas quimiocinas son proteínas de pequeño tamaño, solubles y que son secretadas por múltiples tipos celulares, cuya característica principal es la capacidad de inducir la quimiotaxis de distintas células diana, principalmente leucocitos circulantes. Muchos estudios describen un aumento de la expresión y secreción de quimiocinas en las lesiones ateroscleróticas, como por ejemplo es el caso de la IL-8¹, la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)² y de diversas quimiocinas de tipo CXC (también conocidas como quimiocinas de tipo α) o CC (quimiocinas γ)³. De entre estas últimas destaca la quimiocina CCL20, también conocida como proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-3 α , que fue descubierta en 1997⁴ y que se expresa mayoritariamente en macrófagos, células dendríticas, linfocitos y granulocitos. La unión de CCL20 a su receptor único CCR6, presente en células dendríticas inmaduras y linfocitos B y T, promueve una respuesta migratoria de estas. Además, recientemente también se ha descrito que CCL20 se expresa en células de músculo liso de los vasos sanguíneos susceptibles a desarrollar aterosclerosis. CCL20 también se ha relacionado con la patogénesis de enfermedades como el asma o la enfermedad inflamatoria intestinal^{5,6}.

En este artículo de Calvayrac et al. se describe como los niveles plasmáticos de CCL20 son mayores en pacientes con hipercolesterolemia, aun siendo asintomática, que en pacientes sanos. Este incremento podría derivar de la sobreproducción de esta quimiocina en células de músculo liso vascular y células endoteliales vasculares, pues los estudios