



CLÍNICA E INVESTIGACIÓN EN ARTERIOSCLEROSIS

www.elsevier.es/arterio



COMENTARIOS BIBLIOGRÁFICOS

La metaloproteinasa de matriz (MMP-10) reduce eficazmente el tamaño de infarto en el ictus experimental a través de un aumento de la fibrinólisis vía un mecanismo mediado por el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina

Orbe J, Barrenetxe J, Rodríguez JA, Vivien D, Orset C, Parks WC, et al. Matrix metalloproteinase-10 effectively reduces infarct size in experimental stroke by enhancing fibrinolysis via a thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor-mediated mechanism. *Circulation* 2011;124:2909–19.

Antecedentes: El sistema fibrinolítico y las metaloproteinasas de matriz (MMP) cooperan en la disolución del trombo y en la proteólisis de la matriz extracelular. El sistema plasminógeno/plasmina activa MMP, y algunas MMP han sido implicadas en la disolución de la fibrina actuando directamente sobre fibrina/fibrinógeno o colaborando con la plasmina. La MMP-10 ha sido implicada en procesos inflamatorios/trombóticos y en la integridad vascular, pero se desconoce si la MMP-10 podría tener efecto profibrinolítico y ser un prometedor agente trombolítico.

Métodos y resultados: El efecto de la MMP-10 en la fibrinólisis se estudió *in vitro* e *in vivo*, en ratones deficientes en MMP-10 (*Mmp10*^{-/-}), utilizando 2 modelos murinos de trombosis arterial: lesión carotídea inducida con láser e ictus isquémico. *In vitro*, mostramos que la MMP-10 fue capaz de aumentar la fibrinólisis inducida por el activador tisular del plasminógeno a través de un mecanismo mediado por la inactivación de un inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina. *In vivo*, el retraso de la fibrinólisis observada al inducir una lesión carotídea fotoquímica en ratones *Mmp10*^{-/-} fue revertido por MMP-10 humana recombinante activa. En un modelo de ictus inducido por trombina, la reperusión y el tamaño del infarto en animales control o tratados con activador tisular del plasminógeno se vieron drásticamente alterados en ratones *Mmp10*^{-/-}. En este modelo, la administración de MMP-10 activa a animales salvajes redujo significativamente el tiempo de reperusión sanguínea y el tamaño del infarto en la misma medida que el activador tisular del plasminógeno y se asoció con un

acortamiento del tiempo de sangría sin que se produjese hemorragia intracraneal. Este efecto no se observó en ratones deficientes en el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina, lo que sugiere que la inactivación del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina es uno de los mecanismos implicados en el efecto profibrinolítico de la MMP-10.

Conclusiones: Se describe un nuevo papel profibrinolítico de la MMP-10 en el ictus isquémico experimental, lo que abre nuevas vías para estrategias fibrinolíticas innovadoras en la trombosis arterial.

Comentario

La aterosclerosis es la causa más común de los ictus isquémicos, que también pueden ser causados por un coágulo embolizado que provoca el descenso súbito del flujo sanguíneo en una arteria cerebral principal, normalmente la arteria cerebral media. En el ictus isquémico una de las opciones terapéuticas es el tratamiento trombolítico de urgencia para restaurar lo antes posible el flujo sanguíneo y minimizar de ese modo el daño cerebral y sus secuelas. Este tratamiento consiste en la disolución del coágulo mediante la perfusión intravenosa de activadores del plasminógeno que activan el sistema fibrinolítico. Actualmente la forma recombinante del activador tisular del plasminógeno (rtPA) es el único agente trombolítico aprobado para el ictus isquémico de menos de 3 h de evolución. Sin embargo, el impacto de la trombólisis en la práctica clínica habitual es escaso debido a que menos del 5% de los pacientes con ictus llegan a ser tratados con rtPA. De hecho, la terapia trombolítica actual adolece de importantes limitaciones, como son la necesidad de perfusiones prolongadas del fármaco trombolítico, la estrecha ventana temporal en la que el tratamiento es eficaz o la neurotoxicidad del rtPA, pero sobre todo el riesgo asociado de hemorragia cerebral. Todo ello, evidentemente, limita enormemente su potencial clínico.

Sin duda en la lisis del trombo el sistema activador del plasminógeno/plasmina es fundamental, por lo que se ha tendido a obviar la participación en el proceso de las MMP capaces de proteolizar la fibrina y el fibrinógeno^{1,2}. En trabajos previos el grupo dirigido por la Dra. Josune Orbe y el Dr. José Antonio Páramo había demostrado que la MMP-10 (estromelisin-2), cuya expresión es inducida por estímulos inflamatorios y por la propia trombina, representa una nueva conexión entre inflamación y trombosis³, y que esta MMP puede considerarse un marcador de aterosclerosis

subclínica⁴. En este artículo presentan un trabajo de colaboración con 2 grupos internacionales en el que se identifica y caracteriza un nuevo papel profibrinolítico de la MMP-10. En el estudio se demuestra que MMP-10 «potencia» la actividad fibrinolítica del tPA de modo que es posible reducir sensiblemente la dosis de tPA preservando su efecto máximo *in vitro*. En un ratón deficiente en MMP-10 (*Mmp10*^{-/-}) se constata que el tiempo de sangrado es muy inferior al de animales control, y que el plasma de estos animales presenta un estado hipofibrinolítico que se revierte con la adición de MMP-10 humana recombinante. En ratones *Mmp10*^{-/-} al inducir trombosis a nivel carotídeo se formó un trombo oclusivo más rápidamente, y al inducir ictus mediante la inyección *in situ* de trombina se apreció una menor reperusión espontánea; además, a diferencia de los animales control (normales), no se observó reducción del volumen del infarto al tratar con tPA. Finalmente, se observó que la perfusión de MMP-10 acortaba el tiempo de reperusión y el tamaño del infarto de forma similar al tPA. Mediante espectrometría de masas se identificó el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) como el sustrato de la MMP-10 en este proceso, resultados que se corroboraron *in vivo* al constatar un aumento de la actividad TAFI en animales *Mmp10*^{-/-}.

En resumen, en este estudio los investigadores del CIMA-Universidad de Navarra demuestran que a través de sus funciones profibrinolíticas la MMP-10 puede jugar un importante papel en la trombólisis. Estos datos aportan una base experimental para el desarrollo de futuras estrategias cuyo objetivo sea la optimización de los tratamientos de trombólisis en el ictus isquémico para conseguir protocolos más seguros y aplicables a un mayor número de pacientes.

Bibliografía

1. Bini A, Wu D, Schnuer J, Kudryk BJ. Characterization of stromelysin 1 (MMP-3), matrilysin (MMP-7), and membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) derived fibrin(ogen) fragments D-dimer and D-like monomer: NH2-terminal sequences of late-stage digest fragments. *Biochemistry*. 1999;38:13928–36.
2. Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem*. 2000;275:33008–13.
3. Orbe J, Rodríguez JA, Calvayrac O, Rodríguez-Calvo R, Rodríguez C, Roncal C, et al. Matrix metalloproteinase-10 is upregulated by thrombin in endothelial cells and increased in patients with enhanced thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:2109–16.
4. Orbe J, Montero I, Rodríguez JA, Beloqui O, Roncal C, Páramo JA. Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost*. 2007;5:91–7.

José Martínez-González

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC),
IIB- Sant Pau, Barcelona, España
Correo electrónico: jmartinez@csic-iccc.org

HDL_{Milano} recombinante ejerce propiedades anti-inflamatorias y estabilizantes de la placa superiores a la HDL_{normal}

Ibáñez B, Giannarelli C, Cimmino G, Santos-Gallego CG, Alique M, Pinero A, et al. Recombinant HDL_{Milano} exerts greater anti-inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL_{wild-type}. *Atherosclerosis*. 2012;220:72–7.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue comparar los efectos de la HDL_{Milano} y la HDL_{normal} sobre la regresión y estabilización de la aterosclerosis.

Métodos: Conejos ateroscleróticos *New Zealand White* recibieron 2 perfusiones, con un intervalo de 4 días, de HDL_{Milano} (75 mg/kg de apoA-I_{Milano}), HDL_{normal} (75 mg/kg apoA-I_{normal}) o placebo. El volumen de la placa antes y después del tratamiento se analizó mediante MRI. Se evaluaron marcadores de vulnerabilidad de la placa e inflamación. Se cuantificó el contenido de colesterol del hígado y de la aorta, y los niveles de ABCA-1 y de SR-BI en la aorta y el hígado, respectivamente. Se evaluó el efecto de las proteínas apoA-I Milano y normal en la expresión de MCP-1 y COX-2 en macrófagos *in vitro*.

Resultados: Ambas formas de HDL indujeron regresión de la placa (-4,1 y -2,6% vs. pre-tratamiento en HDL_{Milano} y HDL_{normal} respectivamente, $p < 0,001$ y $p = 0,009$). Se observó una reducción similar en el contenido de colesterol de la aorta y del hígado de ambos tratamientos vs. placebo. La expresión de ABCA-1 en aorta y de SR-BI en hígado fue significativamente mayor en ambos grupos de tratamiento vs. placebo. Se observó una reducción significativa en la densidad de macrófagos en las placas en el grupo de HDL_{Milano} vs. HDL_{normal} o placebo. Los niveles en placa de COX-2, MCP-1, proteína caspasa-3 y actividad MMP-2 fueron significativamente menores en el grupo de HDL_{Milano} vs. HDL_{normal} o placebo. Estudios *in vitro* en macrófagos cargados con oxLDL mostraron que la proteína apoA-I_{Milano} redujo significativamente la expresión de COX-2 y de MCP-1 vs. apoA-I_{normal}.

Conclusiones: A pesar de que la perfusión de HDL_{Milano} produce un efecto similar sobre la regresión aguda de la placa, a corto plazo sus efectos antiinflamatorios y estabilizantes de la placa son superiores a la HDL_{normal}.

Comentario

En el desarrollo de las placas ateroscleróticas la acumulación de material lipídico en la pared arterial induce y perpetúa un estado inflamatorio crónico que incide en la evolución de las placas y en su vulnerabilidad. En contraposición al efecto pro-aterogénico del colesterol-LDL, múltiples estudios epidemiológicos han mostrado una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de HDL y la incidencia de enfermedad arterial coronaria (EAC). Dichos estudios sugieren que por cada 1% de aumento de los niveles de colesterol-HDL se reduce entre un 3 y un 4% el riesgo de EAC. En estudios que fueron pioneros en su tiempo el Dr. Juan José Badimon et al. demostraron que la administración de HDL

inhibía el desarrollo de estrías grasas e inducía regresión de las placas ateroscleróticas en animales (conejos) alimentados con dieta aterogénica rica en colesterol¹. En los últimos años diferentes estudios han reforzado estas observaciones al demostrar que las HDL y algunos de sus componentes, en particular la apoA-I pero también compuestos lipídicos como la esfingosina-1 fosfato, poseen actividades biológicas de las que se derivarían las propiedades protectoras de las HDL frente a la aterotrombosis². Uno de los mecanismos mejor estudiados a través del cual las HDL ejercen sus efectos ateroprotectores es el transporte reverso de colesterol (TRC), proceso por el cual las HDL eliminan el exceso de colesterol de los tejidos periféricos y lo transportan al hígado para su metabolización y eliminación³. Otros efectos de las HDL, como sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, parecen independientes del TRC. Las HDL son unas partículas muy heterogéneas y su potencial ateroprotector puede igualmente no ser equiparable cuando comparamos lipoproteínas de diferentes individuos. El caso más extremo sin duda lo encontramos en las llamadas HDL_{Milano}, correspondientes a una mutación puntual de la apoA-I (apoA-I_{Milano}) identificada originariamente en una familia de Milán cuyos portadores presentan niveles anormalmente bajos de HDL, pero paradójicamente, una incidencia muy baja de aterosclerosis⁴.

En el presente trabajo el Dr. Badimon y colaboradores comparan la actividad antiaterogénica y antiinflamatoria aguda de HDL normales (en lo sucesivo simplemente HDL) frente a HDL_{Milano} en conejos a los que previamente se había inducido la formación de placas mediante una dieta aterogénica. Después de la administración de tan solo 2 dosis de lipoproteínas (75 mg/kg de apoA-I), con una diferencia de 4 días, transcurridos otros 4 días cuantifican el volumen de la placa mediante MRI y analizan una serie de parámetros relacionados con la inflamación y la estabilidad de la placa. Como era previsible, a igualdad de dosis las HDL_{Milano} resultaron más activas e indujeron una mayor reducción de la placa que las HDL (-4,1% vs. -2,6%), lo que se acompañó de una mayor reducción del contenido de macrófagos. Aunque ambas lipoproteínas redujeron de forma similar el contenido de colesterol en la aorta y en el hígado, los efectos antiinflamatorios, estimados a través de niveles en aorta de marcadores como MCP-1 y COX-2, y las propiedades antioxidantes, evaluadas a través de productos de peroxidación lipídica en aorta y plasma, fueron muy superiores con la administración de HDL_{Milano}. Esta superioridad también se constató *in vitro* al comparar los efectos antiinflamatorios de la apoA-I_{Milano} frente a las HDL normales en macrófagos cargados de LDL oxidadas (oxLDL).

En resumen, este estudio ratifica el potencial de las HDL de reducir la carga aterogénica (inducir regresión/estabilización de la placa) cuando se administran a dosis farmacológicas durante un corto espacio de tiempo, y subraya que esta actividad está exacerbada en las HDL_{Milano}, sobre todo en lo referente a efectos antiinflamatorios/estabilizadores de la placa. El hecho de que mínimas diferencias en las características de las HDL, en este caso asociadas fundamentalmente a la apoA-I, tengan efectos tan significativos en la biología de las HDL permite especular sobre la posibilidad de que formas modificadas de estas lipoproteínas puedan contemplarse como una

alternativa terapéutica prometedora para el tratamiento agudo de pacientes de alto riesgo⁵.

Bibliografía

1. Badimon JJ, Badimon L, Galvez A, Dische R, Fuster V. High density lipoprotein plasma fractions inhibit aortic fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Lab Invest.* 1989;60:455-61.
2. Rodríguez C, González-Díez M, Badimon L, Martínez-González J. Sphingosine-1-phosphate: A bioactive lipid that confers high-density lipoprotein with vasculoprotection mediated by nitric oxide and prostacyclin. *Thromb Haemost.* 2009;101:665-73.
3. Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab.* 2008;7:365-75.
4. Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A 2nd, Weisgraber KH, Mahley RW. A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest.* 1980;66:892-900.
5. Redondo S, Martínez-González J, Urraca C, Tejerina T. Emerging therapeutic strategies to enhance HDL function. *Lipids Health Dis.* 2011;10:175.

José Martínez-González

Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC),
IIB-Sant Pau, Barcelona, España
Correo electrónico: jmartinez@csic-iccc.org

La reducción de la actividad NADPH-oxidasa mejora el fenotipo cardiovascular en un modelo murino de síndrome de Williams-Beuren

Campuzano V, Segura-Puimedon M, Terrado V, Sánchez-Rodríguez C, Coustets M, Menacho-Márquez M, et al. Reduction of NADPH-oxidase activity ameliorates the cardiovascular phenotype in a mouse model of Williams-Beuren Syndrome. *PLoS Genet* 2012;8:e1002458.

Una característica esencial del síndrome de Williams-Beuren (WBS) es una arteriopatía generalizada debido a la deficiencia de elastina, que se presenta como estenosis de las arterias grandes y medianas y que produce hipertensión y otras complicaciones cardiovasculares. Se ha demostrado que la delección de una copia funcional del gen NCF1 protege de la hipertensión a parte de los pacientes con WBS, probablemente a través de la reducción del estrés oxidativo mediado por la NADPH-oxidasa (NOX). Ratones DD, portadores en heterocigosis de una delección de 0,67 Mb que incluye el gen ELN, presentaron una arteriopatía generalizada, hipertensión e hipertrofia cardíaca, asociada con

aumento de angiotensina II (angII), parámetros de estrés oxidativo y expresión de NCF1. La reducción de actividad NOX, ya sea genética (por cruzamiento con mutantes NCF1) y/o farmacológica (con el antagonista del receptor tipo 1 de la angII, losartán, o con el inhibidor de NOX apocinina), controló los parámetros hormonales y bioquímicos en los ratones DD, lo que normalizó la presión sanguínea y mejoró la historia cardiovascular. Aportamos datos firmes de la implicación del sistema redox en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular en un modelo de WBS. El fenotipo de estos ratones puede ser mejorado reduciendo la actividad NOX ya sea por intervención genética o farmacológica, probablemente a través de la reducción del estrés oxidativo mediado por angII. Por tanto, la terapia anti-NOX merece ser tenida en cuenta para prevenir complicaciones cardiovasculares potencialmente importantes en WBS, así como otros trastornos cardiovasculares mediados por un mecanismo patogénico similar.

Comentario

El síndrome de Williams-Beuren (WBS) es una enfermedad congénita que afecta ~1/10.000 recién nacidos, causado por la pérdida de material genético (aneusomía segmental de 1,55-1,83 Mb en la banda cromosómica 7q11.23), que incluye el gen ELN codificante para la elastina y 25-27 genes más. Aparte de otras características, estos pacientes presentan una arteriopatía generalizada con estrechamiento de las grandes arterias elásticas¹. A nivel histológico, en las arterias de los individuos con WBS se observa un elevado número de estructuras laminares desorganizadas, fibras elásticas fragmentadas e hipertrofia de las células musculares lisas. Como consecuencia del anormal desarrollo vascular, la mayor parte de estos pacientes desarrollan a lo largo de su vida hipertensión sistémica (40-70% de los pacientes incluso en la niñez) y un elevado riesgo de ictus, isquemia cardíaca y muerte súbita². La deficiencia de elastina parece la principal causa del fenotipo cardiovascular del WBS. De hecho, modelos animales deficientes en heterocigosis del gen de la elastina reproducen la mayoría de alteraciones observadas en el WBS, como la hipertensión asociada a niveles elevados de actividad de renina y de angiotensina II (angII) en plasma³. La angII ejerce efectos celulares directos, pero también indirectos a través de la activación de la NADPH-oxidasa (NOX) y de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Actualmente se acepta que el estrés oxidativo es un componente patológico importante en la hipertensión, la aterosclerosis y en la insuficiencia cardíaca. En un estudio previo, el grupo del Dr. Pérez-Jurado, de la Universitat Pompeu Fabra (UPF, Barcelona), había descrito que los pacientes con WBS a quienes falta una copia del gen NCF1, que codifica para p47^{phox} (subunidad de la NOX), presentan menor riesgo

cardiovascular asociado a un menor estrés oxidativo⁴. En el presente estudio este grupo utiliza un modelo murino (ratón deficiente en elastina) que reproduce en gran medida el fenotipo cardiovascular de los pacientes con WBS, para elucidar la contribución del estrés oxidativo mediado por NOX al fenotipo cardiovascular de este síndrome. Los autores observan que al cruzar los animales deficientes en ELN con una línea de ratones carente de NCF1 se controlaron los parámetros hormonales y bioquímicos de los animales, lo que se tradujo en una normalización de la presión sanguínea y en una mejora de las características histológicas a nivel cardiovascular. Además, en los animales deficientes en elastina la inhibición farmacológica de la activación o la síntesis de NOX (con losartán y apocinina) también rescató el fenotipo cardiovascular.

En resumen, en muchas enfermedades congénitas, aparte de las deficiencias características, las principales complicaciones que limitan la esperanza de vida de estos pacientes son las complicaciones cardiovasculares atribuibles a carencias específicas inherentes a dichas patologías. Debido a la dificultad añadida que en muchos casos supone investigar patologías raras como el WBS, deben aplaudirse aproximaciones experimentales como la que nos ocupa, que subraya la importancia del estrés oxidativo en las complicaciones cardiovasculares de este síndrome, identifica nuevas dianas terapéuticas sobre las que diseñar inhibidores más específicos y sugiere que fármacos disponibles actualmente deberían ser evaluados en pacientes con WBS y alto riesgo cardiovascular.

Bibliografía

1. Pober BR, Johnson M, Urban Z. Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *J Clin Invest*. 2008;118:1606-15.
2. Wessel A, Gravenhorst V, Buchhorn R, Gosch A, Partsch CJ, Pankau R. Risk of sudden death in the Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet A*. 2004;127A:234-7.
3. Faury G, Pezet M, Knutsen RH, Boyle WA, Heximer SP, McLean SE, et al. Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J Clin Invest*. 2003;112:1419-28.
4. Del Campo M, Antonell A, Magano LF, Muñoz FJ, Flores R, Bayés M, et al. Hemizygoty at the NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension. *Am J Hum Genet*. 2006;78:533-42.

José Martínez-González
Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC),
IIB-Sant Pau, Barcelona, España
Correo electrónico: jmartinez@csic-iccc.org