

Hasta ahora existían pocos estudios que hubieran evaluado el efecto de los fármacos hipolipemiantes sobre la expresión de los miARN, destacando un estudio en el cual se implicaba miR-221/222 en los efectos pleiotrópicos de la atorvastatina². No obstante, el estudio de Gómez-Garre et al. solo evalúa miARN previamente relacionados con la diferenciación de monocitos por PMA, pero no investiga otros miARN que podrían llevar a cabo también funciones importantes. De hecho, existen numerosos miARN que intervienen durante el proceso aterogénico, ya sea modulando la función inflamatoria de las células endoteliales, la adhesión de los monocitos, la respuesta de los macrófagos a las LDL oxidadas, o promoviendo la proliferación de células del músculo liso vascular y células endoteliales^{3,4}. Las células periféricas requieren de la exportación de colesterol para mantener su homeostasis lipídica. La salida del colesterol hacia el medio extracelular puede producirse por difusión pasiva; por transferencia de colesterol hacia apolipoproteínas pobres en lípidos por medio del transportador *ATP binding cassette 1* (ABCA1), o por transporte de colesterol hacia lipoproteínas de alta densidad (HDL) maduras a través del transportador ABCG1 o del receptor *scavenger* SR-BI. Una de las rutas más importantes de exportación de colesterol desde el macrófago es la mediada por los transportadores ABCA1 y ABCG1. La modulación farmacológica de estos transportadores se considera una aproximación potencialmente beneficiosa para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. En este sentido, un estudio reciente ha demostrado la utilidad terapéutica de la inhibición selectiva de miR-33a/b en un modelo de mono verde africano⁵, donde se inducía la expresión hepática de ABCA1, proteína clave en el transporte reverso del colesterol desde los tejidos periféricos hacia las HDL, e incrementaba los niveles plasmáticos de HDL. Esto se explicaba porque miR-33a y miR-33b regulan la homeostasis del colesterol mediante la modulación de la expresión génica de ABCA1, ABCG1 y NPC1L1. Teniendo en cuenta que la ezetimiba actúa impidiendo la absorción intestinal del colesterol por inhibición de la proteína transportadora NPC1L1 en las microvellosidades intestinales, y que este fármaco, en combinación con la atorvastatina, presenta un efecto adicional interesante sobre el cHDL, sería interesante determinar si la

ezetimiba también regula miR-33a/b y, con ello, NPC1L1 o ABCA1/G1. También podría resultar interesante comprobar, por ejemplo, su efecto sobre miR-146a, pues se ha visto que este miARN reduce significativamente los niveles de cLDL, incluyendo las LDL oxidadas, así como la secreción de interleucina (IL)-6, IL-8, quimiocinas (CCL2) y metaloproteasas, en macrófagos⁶.

Bibliografía

1. Gomez-Garre D, Munoz-Pacheco P, Gonzalez-Rubio ML, Aragonci-llo P, Granados R, Fernandez-Cruz A. Ezetimibe reduces plaque inflammation in a rabbit model of atherosclerosis and inhibits monocyte migration in addition to its lipid-lowering effect. *Br J Pharmacol*. 2009;156:1218–27.
2. Minami Y, Satoh M, Maesawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, et al. Effect of atorvastatin on microRNA 221/222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:359–67.
3. Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*. 2010;121:1022–32.
4. Schroen B, Heymans S. Small but smart-microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing. *Cardiovasc Res*. 2011;93:605–13.
5. Davalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramirez CM, Warriar NP, Andreo U, et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:9232–7.
6. Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, et al. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Lett*. 2011;585:854–60.

Xavier Palomer

Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM),
Departamento de Farmacología y Química Terapéutica,
Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona,
Barcelona, España
Correo electrónico: xpalomer@ub.edu

<http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2012.12.002>

Implicación de la prostaglandina (PG)_{E2} y la vía de señalización de AMPc en la inducción de la expresión de la ciclooxigenasa 2 y la prostaglandina E₂ sintasa microsomal-1 en macrófagos activados con lipopolisacárido

Díaz-Muñoz MD, Osma-García IC, Fresno M, Iñiguez MA. Involvement of PGE₂ and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. *Biochem J*. 2012;443:451–61.

La prostaglandina (PG) E₂ juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica y el proceso inflamatorio. En este estudio describimos una retroalimentación positiva de la PGE₂ para la expresión de la ciclooxigenasa (COX)-2 y de la PGE sintasa microsomal-1 (mPGES-1) en la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Nuestros resultados muestran que la PGE₂ inducía la expresión de COX-2 y mPGES-1, un efecto que pudo ser mimetizado por el dibutilil AMPc (dbcAMP) o forskolina. Además, la vía de señalización del AMPc cooperaba con el lipopolisacárido (LPS) en la inducción transcripcional de COX-2 y mPGES-1. El análisis de la implicación de los receptores de PGE (prostanoides-E [EP]) demostró que la incubación con agonistas de EP2 incrementó la expresión del ARNm de COX-2 y mPGES-1. Asimismo, la sobreexpresión del receptor EP2 aumentó la activación

transcripcional de los promotores de *COX-2* y *mPGES-1*. Esta inducción fue reprimida mediante tratamiento con el inhibidor de la proteína cinasa A (PKA) H89. La activación de la vía de señalización PGE_2 /EP2/PKA indujo la fosforilación de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc, CRE) en macrófagos, y estimuló la unión específica de este factor de transcripción a los promotores de *COX-2* y *mPGES-1*. La supresión o mutación de los sitios potenciales de unión CRE en ambos promotores disminuyó su actividad transcripcional. En resumen, los resultados de este estudio demuestran que la activación de la señalización PKA/CREB mediante el receptor EP2 activado por PGE_2 juega un papel clave en la expresión de *COX-2* y *mPGES-1* en macrófagos activados.

Comentario

La aterosclerosis es una enfermedad en cuya progresión subyace un proceso inflamatorio crónico, como resultado de una disfunción endotelial. En las zonas donde se produce esta disfunción endotelial aumenta la permeabilidad vascular, favoreciendo la infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) hacia el espacio subendotelial de la pared vascular. En estas regiones se incrementa la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas atrayentes, que favorecen el reclutamiento de monocitos. Estos monocitos son capaces de diferenciarse a macrófagos, un tipo celular que puede captar LDL oxidadas y convertirse así en células espumosas, que juegan un papel central en todas las etapas de la patogénesis de la aterosclerosis. Los macrófagos son efectores del sistema inmune innato que son activados por distintos estímulos asociados con factores de riesgo para la aterosclerosis, como las propias LDL oxidadas, productos glucosilados, angiotensina II o endotelina. Los macrófagos secretan especies reactivas de oxígeno y citocinas, como la interleucina (IL)-1 o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Algunos de los tratamientos cardiovasculares actuales, como los inhibidores del receptor de angiotensina II, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, la aspirina o los agentes hipocolesterolemiantes (principalmente las estatinas), pueden inhibir estos macrófagos, pero la mayoría de fármacos antiinflamatorios, como los glucocorticoides o la ciclofosfamida, presentan efectos adversos severos y son inapropiados para prevenir su actividad¹. Esto hace necesario el desarrollo de nuevas terapias antiinflamatorias, para lo cual es esencial conocer con gran detalle el funcionamiento y la regulación a nivel molecular de estos macrófagos.

El factor de transcripción nuclear NF- κ B regula la expresión de muchos de los genes inflamatorios relacionados con el proceso aterogénico. Uno de sus genes diana es la *COX-2*, una enzima inducida en respuesta a estímulos inflamatorios que cataliza la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina (PG) H_2 y que ha sido asociada frecuentemente con la arteriosclerosis y la hipertensión. La PGH_2 se convierte, por medio de la acción de la PGE sintasa (PGES), en tejido vascular, en PGE_2 , una molécula proinflamatoria y vasoconstrictora. En consecuencia, la síntesis de PGE_2 resulta de la actividad coordinada de la COX y de la PGES. Ambas enzimas existen en forma constitutiva (COX-1 y PGES citosólica o cPGES) e inducible (COX-2 y PGES microsomal-1 o mPGES-1). El acoplamiento funcional entre las formas

inducibles COX-2 y mPGES-1 ha sido propuesto como responsable de la regulación de la biosíntesis vascular de PGE_2 en condiciones inflamatorias. La mPGES-1 se induce por los mismos estímulos que la COX-2 y, de hecho, la mPGES-1 parece estar funcionalmente acoplada a la COX-2, mostrando una activación coordinada.

Los macrófagos pueden generar grandes cantidades de PGE_2 durante la respuesta inducida por estímulos inflamatorios como el LPS, la IL-1 o el TNF- α , debido precisamente al incremento de las enzimas COX-2 y mPGES-1. Los mecanismos moleculares que regulan la síntesis de PGE_2 en macrófagos implican el control transcripcional de NF- κ B, CREB/AP-1 y C/EBP. El estudio de Iñiguez et al. descrito aquí continúa un estudio publicado anteriormente en el que se demostraba que NF- κ B y el factor de respuesta a crecimiento temprano (EGR)-1 actúan de forma coordinada para incrementar la expresión de *COX-2* y *mPGES-1* en macrófagos inducidos con LPS, incrementando la producción de PGE_2 ². Ahora, los mismos autores demuestran que la PGE_2 induce la activación transcripcional de *COX-2* y *mPGES-1* en macrófagos de ratón inducidos con LPS, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva que implica la activación del receptor EP2 y la vía de señalización AMPc/PKA/CREB.

Los prostanoideos, después de ser sintetizados y exportados fuera de la célula, ejercen su función biológica mediante su unión a los receptores de prostanoideos. La PGE_2 , en concreto, actúa por medio de los receptores acoplados a proteínas G conocidos como prostanoide E (EP) 1, EP2, EP3 y EP4, que activan o inhiben sistemas de segundos mensajeros en el interior celular. El receptor EP1 causa una afluencia de calcio y la activación de la proteína cinasa C, mientras que el EP4, al contrario que el EP3, activa la adenilato ciclasa, incrementando por tanto los niveles de AMPc. El receptor EP2, de manera similar a EP4, está acoplado a proteínas $G_{\alpha s}$, que activan la adenilato ciclasa e incrementan la formación de AMPc y, por lo tanto, inducen la actividad de la PKA. Este AMPc parece ser el principal segundo mensajero intracelular de PGE_2 en macrófagos, modulando en gran parte su función. La PKA es una holoenzima que consiste de un dímero regulador en el cual cada subunidad reguladora está unida a una subunidad catalítica. En presencia de niveles reducidos de AMPc, la holoenzima permanece catalíticamente inactiva por unión a las subunidades reguladoras. En cambio, cuando se incrementan los niveles de AMPc, ya sea por activación de adenilato ciclasas o por inhibición de fosfodiesterasas (enzimas que degradan AMPc), éste se une a sitios de unión específicos en la subunidad reguladora, hecho que provoca la liberación y la activación de las subunidades catalíticas. La activación de PKA por AMPc puede resultar en la fosforilación del factor de transcripción CREB, que interactúa con CRE, resultando en una expresión génica dependiente de AMPc. Aquí, los autores muestran que la PGE_2 incrementa la fosforilación de CREB y la actividad transcripcional dependiente de CRE, responsable del incremento de la expresión de *COX-2* y *mPGES-1*, siendo la primera vez que se implica este factor de transcripción en la regulación de la expresión de *mPGES-1*. Por otro lado, la PKA es una de las cinasas que puede fosforilar la subunidad p65 de NF- κ B en serina 276 e incrementar su actividad transcripcional³, sugiriendo otra vía de investigación futura interesante.

En resumen, y a pesar de que este estudio se ha limitado sólo a investigar la vía AMPc/PKA/CREB activada por PGE_2 en

una línea celular murina, es factible pensar que también en macrófagos humanos esta PGE₂ podría inducir la activación transcripcional de *COX-2* y *mPGES-1* mediante un mecanismo de retroalimentación positiva. Esta retroalimentación positiva podría ser importante en el proceso de regulación de los procesos inflamatorios inducidos por las prostaglandinas, y constituiría una amplificación de la señal que podría jugar un papel clave en la modulación del proceso inflamatorio durante la aterosclerosis.

Bibliografía

1. Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005;3:63–8.
2. Díaz-Muñoz MD, Osma-García IC, Cacheiro-Llaguno C, Fresno M, Iniguez MA. Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and

microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. *Cell Signal*. 2010;22:1427–36.

3. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799:775–87.

Xavier Palomer

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

Departamento de Farmacología y Química Terapéutica, Facultad de Farmacia – Universitat de Barcelona,

Barcelona E-08028, España

Correo electrónico: xpalomer@ub.edu

<http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2012.12.003>

Cambios en el proteoma del miocardio en un modelo experimental de diabetes crónica e hipertensión: papel de receptor activado por proliferadores peroxisómicos de tipo alfa en la hipertrofia asociada

Ares-Carrasco S, Picatoste B, Camafeita E, Carrasco-Navarro S, Zubiri I, Ortiz A, Egido J, López JA, Tuñón J, Lorenzo O. Proteome changes in the myocardium of experimental chronic diabetes and hypertension: role of PPAR α in the associated hypertrophy. *J Proteomics*. 2012;75:1816–29.

La diabetes con o sin presencia de hipertensión daña el corazón. No obstante, actualmente no existe suficiente información sobre las patologías asociadas y la alteración de las proteínas implicadas. Por esta razón, nosotros estábamos interesados en la interacción potencialmente sinérgica entre la diabetes y la hipertensión en el corazón, centrándonos en la caracterización proteómica de los fenotipos patológicos y la respuesta hipertrófica asociada. Con este objetivo, tratamos ratas normotensas y ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con estreptozotocina o vehículo. Después de 22 semanas, se estudiaron los ventrículos izquierdos de animales con diabetes tipo 1 (DM1), SHR, SHR/DM1 y control, mediante técnicas de proteómica. El análisis proteómico reveló que las ratas DM1, SHR y SHR/DM1 de larga duración presentaban, respectivamente, 24, 53 y 53 proteínas alteradas en el miocardio. El miocardio de los animales DM1 mostraba una sobreexpresión de proteínas apoptóticas y del citoesqueleto, y una disminución de enzimas anti-apoptóticas y del metabolismo mitocondrial. Estos cambios se vieron exacerbados en las ratas SHR y SHR/DM1, además de presentar una reducción en las enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos libres. Además, los corazones de ratas SHR/DM1 presentaban un desequilibrio en los factores

específicos pro-hipertróficos, anti-apoptóticos y transportadores de ATP mitocondrial, que podrían causar un daño adicional. Las proteínas con expresión diferencial fueron validadas y, posteriormente, agrupadas en vías metabólicas específicas mediante la aplicación de técnicas de bioinformática. Estos estudios sugieren la implicación de los ácidos grasos libres y los receptores nucleares, así como de factores hipertróficos, en estas patologías. Aunque las enzimas de la β -oxidación no se indujeron en el corazón de ratas con DM1 o hipertensión, los receptores activados por proliferadores peroxisómicos de tipo α (PPAR α) fueron potencialmente activados por otras respuestas. En este sentido, la estimulación de PPAR α redujo la hipertrofia y los factores pro-hipertróficos como la anexina V en cardiomiocitos inducidos mediante tratamiento con concentraciones elevadas de glucosa o angiotensina II. Por lo tanto, la activación de PPAR α podría reflejar una respuesta compensatoria al cambio metabólico y el estatus apoptótico e hipertrófico que se produce durante la cardiomiopatía diabética e hipertensiva.

Comentario

La diabetes es una de las principales causas de insuficiencia cardíaca pues, si no se corrige, puede provocar hipertrofia cardíaca. Este proceso puede verse exacerbado cuando esta diabetes coexiste con hipertensión arterial, uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. El catabolismo de los ácidos grasos por medio de la β -oxidación mitocondrial es la principal fuente de producción de energía en el corazón sano, pero en respuesta a la hipertrofia se produce una respuesta adaptativa encaminada a incrementar la utilización de glucosa en detrimento de los ácidos grasos. Cuando aparece la resistencia a la insulina, se incrementa de nuevo el metabolismo de los ácidos grasos, hecho que favorece una acumulación de lípidos y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Al final se producirá un declive de la utilización tanto de ácidos grasos como de glucosa, alterándose la producción de energía y