

ORIGINAL

El receptor nuclear NOR-1 regula la activación de las células vasculares y el remodelado vascular en respuesta a estrés hemodinámico[☆]



Ricardo Rodriguez-Calvo^a, Anna Guadall^a, Olivier Calvayrac^a, Judith Alonso^a, Beatriz Ferran^a, Ingrid Martí^a, María Ángeles Navarro^c, Alicia de Diego^b, Jesús Osada^c, Cristina Rodríguez^a y José Martínez-González^{a,*}

^a Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona, España

^b Unidad de Transgénesis del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, España

^c Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza y CIBEROBN, Zaragoza, España

Recibido el 29 de octubre de 2013; aceptado el 4 de noviembre de 2013

Disponible en Internet el 12 de marzo de 2014

PALABRAS CLAVE

NOR-1;
Receptores
nucleares;
Activación de células
musculares lisas
vasculares;
Remodelado vascular;
Restenosis

Resumen

Introducción: Estudios previos sugieren que la pérdida de función de NOR-1 modula la activación de las células musculares lisas vasculares (CMLV). En este estudio utilizamos un ratón que sobreexpresa NOR-1 en CMLV para analizar su efecto en la activación celular y en la hiperplasia de la íntima inducida por estrés hemodinámico.

Métodos: Para generar el modelo animal el ADNc de NOR-1 humano se situó bajo el control del promotor de SM22α. La expresión de NOR-1 se analizó mediante PCR a tiempo real, Western-blot, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica, y su funcionalidad se determinó mediante ensayos de actividad luciferasa. Como índice de proliferación celular se determinó la incorporación de timidina tritiada. La carótida izquierda se sometió a ligadura y en secciones de la misma se realizaron análisis morfométricos e inmunohistoquímicos.

Resultados: El transgénico desarrollado exhibía niveles significativos de NOR-1 humano en la aorta y las arterias carótidas. En las CMLV de los animales transgénicos se detectó un aumento de la actividad transcripcional de la ciclina D2, una mayor actividad proliferativa y niveles incrementados de Myh10. En estos animales la ligadura de la carótida indujo mayor formación de neoíntima y de estenosis que en los animales control, en consonancia con el marcaje de Myh10 e histona H3 fosforilada.

Conclusiones: Estos resultados refuerzan el papel de NOR-1 en la proliferación de las CMLV y en el remodelado vascular, y permiten proponer este modelo como una herramienta útil para estudiar la implicación de este receptor en la función vascular y en enfermedades como la arteriosclerosis y la reestenosis.

© 2013 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

[☆] Una comunicación referente a esta línea de trabajo, titulada «El receptor nuclear NOR-1 media la respuesta vascular a daño mecánico y modula la inflamación: resultados de un modelo animal que sobreexpresa NOR-1 específicamente en CMLV», se presentó en el xxv Congreso Nacional de la SEA (Reus, 2012) y fue galardonada con una mención especial.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jmartinez@csic-iccc.org (J. Martínez-González).

KEYWORDS

NOR-1;
Nuclear receptors;
Vascular smooth
muscle cells
activation;
Vascular remodelling;
Restenosis

The nuclear receptor NOR-1 regulates the activation of vascular cells and vascular remodelling in response to hemodynamic stress**Abstract**

Introduction: Previous studies have shown that the loss of NOR-1 function modulates the activation of vascular smooth muscle cells (VSMC). In this study we use a mouse that over-expresses human NOR-1 in VSMC to analyze the effect of a gain of NOR-1 function on the activation of VSMC and in the hyperplasia of the intima induced by hemodynamic stress.

Methods: To generate the transgenic animal the human NOR-1 cDNA was placed under the control of the SM22 α promoter. The expression of NOR-1 was analyzed by real time PCR, Western blot, immunohistochemistry and immunocitochemistry, and NOR-1 functionality was evaluated by luciferase activity assays. The incorporation of tritiated thymidine was determined as a cell proliferation index. The left carotid artery was ligated, and cross-sections were subjected to morphometric and immunostaining analysis.

Results: The transgenic mouse exhibited significant levels of human NOR-1 in aorta and carotid arteries. In aortic VSMC from transgenic mice an increase in the transcriptional activity of cyclin D2 was detected, as well as higher proliferative rates and increased levels of the marker Myh10. In these animals, carotid artery ligation induced a greater neointimal formation and a higher stenotic grade than in wild-type animals, in accordance with the labelling detected for Myh10 and phosphorylated Histone H3.

Conclusions: These results reinforce the role of NOR-1 in VSMC proliferation and in vascular remodelling, and allow us to propose this model as a useful tool to study the involvement of NOR-1 in vascular function and in vascular diseases such as atherosclerosis and restenosis.

© 2013 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

La inflamación vascular y la proliferación de las células musculares lisas vasculares (CMLV) son elementos fundamentales en el remodelado vascular y en el engrosamiento de la íntima tanto en la aterosclerosis como en la reestenosis asociada a intervenciones que inducen daño vascular, como la angioplastia^{1,2}. Durante el desarrollo de estas patologías se producen una serie de modificaciones en el perfil de expresión génica que conllevan la alteración de la capacidad adhesiva, migratoria, proliferativa y secretora de las células vasculares^{3,4}. Distintos miembros de la superfamilia de receptores nucleares hormonales han sido propuestos como factores de transcripción responsables de estas alteraciones^{5,6}. Sin embargo, a pesar de los avances en los últimos años, los mecanismos implicados en la progresión de estas enfermedades no han sido completamente caracterizados.

Los receptores nucleares huérfanos de la familia de NR4A han emergido en los últimos años como nuevas dianas implicadas en la aterosclerosis^{7,8}. Esta familia de receptores está constituida por Nur77, Nurr1 y NOR-1 (NR4A1, NR4A2 y NR4A3, respectivamente, según la nomenclatura unificada para los receptores nucleares)^{7,9}. Estos receptores actúan como factores de transcripción independientes de ligando y constitutivamente activos¹⁰. Presentan una baja expresión basal en células quiescentes que se induce rápidamente por estímulos extracelulares comportándose como genes de respuesta temprana^{7,9}. La expresión de los 3 receptores NR4A se encuentra incrementada en placas ateroscleróticas de arterias coronarias humanas¹¹⁻¹⁶ y está inducida en arterias de modelos porcinos y murinos sometidos a lesión vascular^{12,17}. La expresión de NOR-1 aumenta

en respuesta a estímulos mitogénicos tanto en CMLV^{11-13,17,18} como en células endoteliales^{16,19-21}, y su inhibición reduce la proliferación de estas células inducida por diferentes estímulos^{11,17,18,20,21}. Sin embargo, los resultados obtenidos en animales modificados genéticamente han sido contradictorios. En ratones transgénicos que sobreexpresan un dominante negativo que suprime la actividad de los 3 NR4A se produce un incremento en la formación de neoíntima tras la ligadura de la arteria carótida¹³. Sin embargo, estudios recientes realizados en ratones deficientes para NOR-1 muestran un descenso en la formación de neoíntima tras la inducción de lesión por denudación endotelial de la arteria femoral²². Ante estos resultados discordantes hemos generado un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa NOR-1 específicamente en CML para aclarar la contribución de este receptor nuclear en la activación de las CMLV y en el remodelado vascular desencadenado por el estrés hemodinámico asociado a la ligadura de la arteria carótida, proceso que induce inflamación y sobre todo hiperplasia íntimal.

Métodos

Generación de un vector de expresión de NOR-1 humano

El vector de expresión de NOR-1 se generó a partir del ADNc de NOR-1 humano que se extrajo de la construcción pBlueScript-NOR-1 (cedida amablemente por el Dr. N. Ohkura, Growth Factor Division, National Cancer Center Research Institute, Tokio, Japón)²³. El ADNc de NOR-1 se clonó en el vector pCAGGS-SM, el cual contiene el promotor

mínimo de la SM22 α (transgrelina) de ratón. En la construcción resultante el ADNc humano de NOR-1 está fusionado a la secuencia de poli-A del gen de la β -globina de conejo y se encuentra sometido al control específico del promotor de la SM22 α que dirige la expresión a CML.

Generación del ratón transgénico TgNOR-1^{+CML}

El casete de expresión (3,6 kb) fue recuperado por doble digestión con *Sall* y *HindIII*, purificado mediante el kit *QIAquick™ Gel Extraction* (Qiagen) y utilizado para la inyección pronuclear de cigotos y posterior transferencia al tracto reproductivo de hembras pseudogestantes (Crl:CD-1), como se describió previamente²⁴. Al cabo de 3 semanas tras el nacimiento de los animales, el ADN genómico de la descendencia resultante fue analizado mediante PCR para detectar la presencia del transgén, como se describe más adelante. Se estableció una línea estable de ratones transgénicos mediante el cruce de los animales fundadores portadores del transgén con ratones C57BL/6J durante más de 10 generaciones para garantizar el 99,9% de pureza en este fondo genético.

Estos procedimientos se llevaron a cabo en la Unidad de Transgénesis del Instituto de Ciencias de la Salud de Aragón y en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigación Cardiovascular y fueron aprobados por los Comités Éticos de Experimentación Animal de ambas instituciones. Los animales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos (*specific pathogen free [SPF]*) bajo condiciones estándar de iluminación (ciclos de 12 h de luz/oscuridad) y temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) en la Unidad de Experimentación Animal (CSIC-ICCC, Barcelona, España), con acceso ad libitum a bebida y alimento.

Análisis de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de los animales se realizó a partir de biopsias de las colas utilizando el kit *DNeasy® Blood & Tissue* (Qiagen). La presencia del transgén se determinó mediante PCR convencional con los siguientes oligonucleótidos que detectan un fragmento de 579 pb correspondiente a la secuencia del ADNc de NOR-1 humano: 5'-GACAGACTGCTCCAACTTGG-3' y 5'-GGTCATGATCTCCGTGGTG-3'. Los productos amplificados se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% que contenía bromuro de etidio, y fueron visualizados bajo luz UV. Las imágenes se captaron usando el *BIO-RAD Gel Doc 1000 Multi-Analyxt 1.1* (Bio-Rad).

Cultivo celular

Las CMLV de aorta de ratón se obtuvieron mediante la técnica de explantes²⁵. Las CMLV se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco) suplementado con un 20% de suero bovino fetal (Biological Industries) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomicina). Estas células se sembraron en placas multipicillo para la realización de experimentos de transfección y para la obtención de ARN y extractos proteicos, como se describe más adelante.

Análisis de los niveles de ARNm

El ARN total de cultivos celulares y de tejidos de ratón se aisló utilizando el reactivo Ultraspec™ (Biotecx Laboratories) y el kit *RNeasy Micro* (Qiagen), respectivamente. La integridad del ARN se determinó por electroforesis en gel de agarosa. 1 μg de ARN total fue retrotranscrita a ADNc utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). La cuantificación del nivel de ARNm se realizó por PCR a tiempo real utilizando el equipo *ABI PRISM 7900HT sequence detection system* (Applied Biosystems) y sondas específicas para NOR-1 humano (*Assay-on-Demand*). Se analizó el nivel de expresión de TBP (*TATA-binding protein*) como referencia para la normalización de los resultados²⁶.

Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica

Las arterias aortas y carótidas de ratón fueron perfundidas con PBS, aisladas y fijadas en paraformaldehído al 4% durante 24 h. Las muestras se incluyeron en parafina y se prepararon secciones de 5 μm mediante un microtomo (Jung RM2055, Leica)^{27,28}. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron, se trataron con peróxido de hidrógeno al 10%, para eliminar la actividad peroxidasa del tejido, y se bloquearon con suero al 10%. A continuación se incubaron con un anticuerpo contra NOR-1 (Abnova), Myh10 (Abcam) o histona 3 fosforilada (Abcam) durante toda la noche a 4°C . Tras lavados exhaustivos se aplicó el anticuerpo secundario biotinilado (Vector Laboratories). El procedimiento continuó con la adición del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC; Vector Laboratories) y la aplicación del cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Tras el desarrollo del color, las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratadas y montadas. Para descartar una interacción no específica se incluyeron controles negativos, en los cuales se omitió el anticuerpo primario.

En los análisis por inmunocitoquímica, las CMLV se sembraron en *Permanox® Chamber Slides* (Lab-Tek®) y se cultivaron en medio sin suero durante 48 h. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 min, se bloquearon y se siguió el protocolo Vectastain ABC (HRP-DAB; Vector Laboratories) descrito anteriormente.

Aislamiento de extractos nucleares

Las CMLV se recogieron en 1,5 ml de PBS frío, se centrifugaron a $300 \times g$ durante 15 s y se resuspendieron en 300 μl de tampón A frío (10 mM HEPES pH 7,8 a 4°C , 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT, y 1 x CIP, Calbiochem). Las células se incubaron a 4°C durante 15 min, y tras adicionar NP-40 al 0,6% se vortearon durante 15 s y se centrifugaron 30 s a $12.000 \times g$. A continuación el sedimento nuclear se resuspendió en 50 μl de tampón C frío (25 mM HEPES pH 7,8 a 4°C , 10% glicerol, 400 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT y 1 x CIP, Calbiochem) y se incubó en hielo durante 30 min. Los restos de cromatina nuclear fueron eliminados por centrifugación de 5 min a 4°C , y el sobrenadante, que constituía el extracto nuclear, se conservó a -80°C .

La concentración de proteína se determinó mediante el método de BCA (Pierce).

Análisis de Western-blot

Para la obtención de extractos de proteína total, las CMLV en cultivo se lavaron con PBS y se lisaron en tampón de lisis (50 mM Hepes pH 7,4, 150 mM NaCl, 100 mM NaF, 10 mM NaPPi, 10 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 5 µM leupeptina y 0,5% SDS)²⁹. Las proteínas nucleares o el extracto total se resolvieron en condiciones reductoras en geles de SDS-poliacrilamida (10%) y se transfirieron a membranas de polivinilideno (Immobilon, Millipore). Las membranas se incubaron con anticuerpos contra NOR-1 humano (Abnova), Myh10 (Abcam) o GAPDH (Sigma). Los anticuerpos unidos se detectaron tras la incubación con el anticuerpo apropiado conjugado a HRP (Dako) mediante el *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific). La

igualdad de carga proteica fue verificada por tinción con Ponceau y mediante el análisis del nivel de expresión de GAPDH²⁶.

Ensayos de transfección transitoria y actividad luciferasa

En los experimentos de transfección transitoria se utilizó una combinación de Lipofectamine™ LTX y Plus™ Reagent (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Las CMLV de ratones normales y de TgNOR-1^{+SMC} se transfecaron con un vector reportero de luciferasa que contenía el promotor de la ciclina D2, gen diana de los receptores NR4A^{12,22}. La actividad luciferasa se determinó en lisados celulares utilizando el sistema *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega) y un luminómetro (Orion, Berthold Detection Systems). Los resultados fueron normalizados por la actividad Renilla (E2271, Promega).

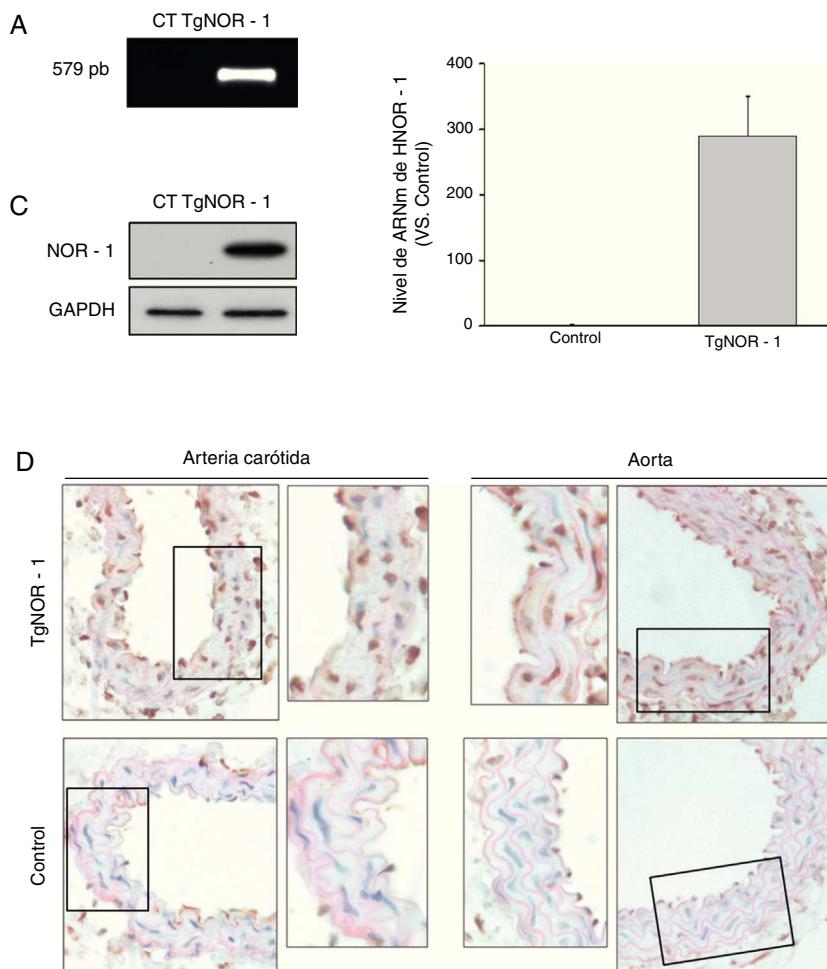


Figura 1 Caracterización de la expresión de NOR-1 en la pared vascular de los ratones transgénicos (TgNOR-1^{+CMV}). A) Tinción con bromuro de etidio del gel de agarosa en la que se muestra el fragmento de NOR-1 amplificado por PCR (579 pb) a partir de ADN genómico de ratones transgénicos (TgNOR-1). El amplicón no se detecta en ADN genómico de animales normales (Control, CT). B) Nivel de ARNm de NOR-1 humano analizado por PCR a tiempo real en la aorta de los animales transgénicos. En los ratones control no se detectó la expresión de NOR-1 humano, pero se le atribuyó un valor de 1 con fines comparativos. Los datos se expresan como la media ± SEM de al menos 9 animales. *p < 0,001 vs. control. C) Niveles de proteína de NOR-1 determinados por Western-blot en la aorta de estos animales. Los niveles de GAPDH se muestran como control de carga. D) Análisis inmunohistoquímico de NOR-1 realizado en las arterias carótida (izquierda) y aorta (derecha) procedente de ratones transgénicos (superior) y control (inferior).

Determinación de la síntesis de ADN

La síntesis de novo de ADN se determinó a través del análisis de la incorporación de timidina tritiada, como se ha descrito previamente³⁰. Brevemente, las CMLV se incubaron con 0,5 µCi/ml de [³H]-timidina (23 Ci/mmol; Amersham) durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, la monocapa de células se lavó con PBS, las células se fijaron con metanol al 95%, se trataron con TCA al 10% (4°C) y se disolvieron en NaOH 0,3 N. La incorporación de [³H]-timidina se determinó en un contador β modelo LS 6500 Multipurpose Scintillation Counter; Beckman Culter™.

Ligadura de la arteria carótida

La ligadura de la arteria carótida izquierda fue realizada en ratones TgNOR-1^{+CML} y animales normales (controles) de 4 meses de edad³¹. Los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de ketamina (45 mg/kg) y medetomidina (0,6 mg/kg). La arteria carótida izquierda fue expuesta y ligada en la zona proximal de la bifurcación de la carótida con una sutura de seda de 7-0. Al cabo de 3 semanas tras el procedimiento quirúrgico, los animales fueron sacrificados y la arteria carótida izquierda fue extraída, fijada en parafina para los análisis morfométricos e inmunohistoquímicos³².

Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético del Centro de Investigación Cardiovascular de Barcelona. La manipulación de los animales se realizó conforme al RD53/2013, que cumple la normativa 2010/63/UE de la Unión Europea relativa a la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

Análisis morfométricos e inmunohistoquímicos

A partir de las arterias incluidas en parafina se prepararon secciones seriadas de 5 µm de espesor con un micrótomo (Leica JUNG RM 2055). Las secciones correspondientes a las regiones situadas a 0,8, 1,2 y 1,6 mm del punto de ligadura se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las imágenes, captadas con microscopio (Olympus Vanox AHBT3), se analizaron con el programa informático ImageJ (NIH, Bethesda, MD). Se determinó el área de la capa media, que corresponde al área comprendida entre la lámina elástica externa (LEE) y la lámina elástica interna (LEI). El área de la capa íntima se define como el área comprendida entre la superficie de la luz y la LEI. El porcentaje de estenosis se calculó como: [área íntima/(área íntima + área luz)] × 100.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (a menos que se indique lo contrario). Las diferencias significativas (para p < 0,05) se establecieron mediante la prueba t de Student, o el estadístico U de Mann-Whitney para datos no pareados, utilizando el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Resultados

Generación y caracterización de un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa NOR-1 humano en CML

Para dirigir la expresión de NOR-1 humano a CML la secuencia codificante fue clonada en el vector pCAGGS, bajo el

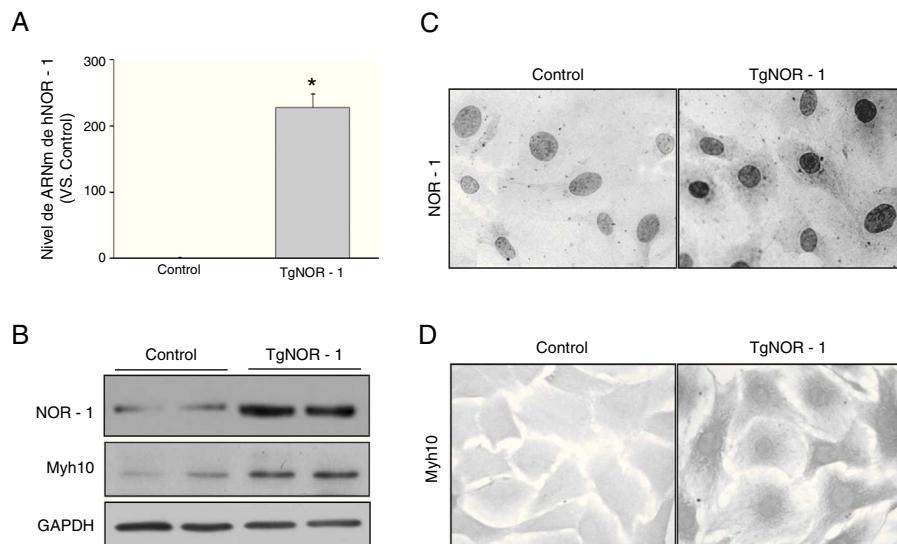


Figura 2 NOR-1 se sobreexpresa en CMLV de aorta de ratones TgNOR-1^{+CML}. A) Niveles de ARNm de NOR-1 humano (hNOR-1) analizado por PCR a tiempo real en CMLV de aorta de los ratones transgénicos (TgNOR-1). La expresión de NOR-1 humano fue indetectable en las células de los ratones control, pero se asignó valor arbitrario de 1 con fines comparativos. Los datos se expresan como la media ± DE (n = 6). *p < 0,001 vs. CT. B) Nivel de expresión de NOR-1 y del marcador Myh10 analizados por Western-blot en extractos nucleares y en lisado celular, respectivamente, de CMLV de animales control y transgénicos. Los niveles de GAPDH se muestran como control de carga. C,D) Caracterización mediante inmunocitoquímica de la expresión de NOR-1 (C) y Myh10 (D) en estas células de animales control y transgénicos.

control del promotor mínimo de la SM22 α . El transgén se microinyectó en el pronúcleo masculino y los embriones fueron transferidos a hembras pseudogestantes. A las 3 semanas del nacimiento se identificaron los animales portadores del transgén ($TgNOR-1^{+CML}$) mediante PCR a partir de ADN genómico procedente de la cola, obteniéndose un 20% de la descendencia portadora (fig. 1A). Para evaluar la transmisión de NOR-1 humano en la línea germinal, los animales fundadores fueron cruzados con animales no transgénicos C57BL/6J. La descendencia obtenida presentó la frecuencia mendeliana esperada, indicando que la transgénesis de NOR-1 no afectaba al desarrollo ni a la viabilidad embrionaria. Los ratones transgénicos se cruzaron con ratones C57BL/6J durante más de 10 generaciones para garantizar más del 99,9% de pureza en este fondo genético. Se verificó la sobreexpresión de NOR-1 en la aorta de los animales transgénicos mediante PCR a tiempo real y Western-blot (fig. 1B y C). Asimismo, los análisis inmunohistoquímicos realizados en la aorta y en la arteria carótida de los animales transgénicos demostraron una mayor expresión vascular de NOR-1, el cual presentaba la localización nuclear esperada (fig. 1D).

Las CMLV de aorta de los ratones $TgNOR-1^{+CML}$ muestran niveles elevados de NOR-1 y cambio en marcadores de diferenciación celular

Las CMLV procedentes de la aorta de ratones transgénicos presentaron niveles elevados de ARNm de NOR-1 humano en comparación con las células obtenidas a partir de animales normales (controles) (fig. 2A). En concordancia, se observó que las células de ratones transgénicos exhibían una elevada expresión nuclear de este factor de transcripción, como demostraron los análisis por Western-blot en extractos nucleares y los estudios inmunocitoquímicos (fig. 2B y C). Además, estas células presentaban niveles incrementados de la proteína Myh10, considerada un marcador de fenotipo sintético de las CML que se encuentra incrementado en células CMLV activadas (proliferantes) (fig. 2B y D)³³.

Las CMLV de aorta de los ratones $TgNOR-1^{+CML}$ muestran una mayor actividad mitogénica que las células procedentes de animales normales

Para determinar si las CMLV de los ratones transgénicos presentaban una alteración en la tasa de proliferación, como sugerían los resultados de la figura 2B y D, evaluamos la tasa de incorporación de timidina tritiada al ADN como índice de actividad proliferativa^{7,18}. Como se muestra en la figura 3A, las CMLV procedentes de ratones transgénicos mostraron una mayor actividad proliferativa que las células de los animales normales, efecto que fue patente tanto en células quiescentes como en células estimuladas con suero fetal bovino (+ FCS). Paralelamente, estudios de transfección transitoria con una construcción reportera de luciferasa que contenía el promotor de la ciclina D2 (diana de los receptores NR4A)²² mostraron que la actividad de esta construcción era significativamente superior en CMLV de ratones transgénicos (fig. 3B).

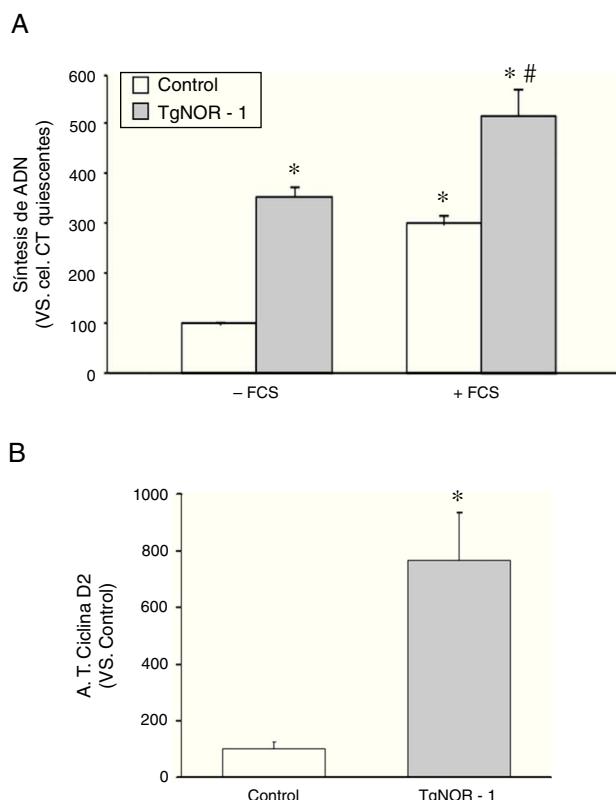


Figura 3 Actividad proliferativa de las CMLV de aorta de los ratones $TgNOR-1^{+CML}$. A) Incorporación de timidina tritiada al ADN en CMLV de aorta procedentes de ratones control y transgénicos (TgNOR-1). Los análisis se realizaron en células quiescentes estimuladas o no con 20% de suero fetal bovino (+FCS). Los datos se expresan como la media \pm DE ($n = 6$). * $p < 0,001$ vs. control no estimuladas (-FCS); # vs. CMLV control estimuladas (+FCS) y respecto a CMLV transgénicas no estimuladas (-FCS). B) Actividad luciferasa del promotor reportero de la ciclina D2 evaluada en CMLV de ratones control y transgénicos transfectadas con una construcción en pGL3 del promotor de la ciclina D2. Los datos se expresan como la media \pm DE ($n = 6$). * $p < 0,001$ vs. control.

Los ratones $TgNOR-1^{+CML}$ presentan un mayor remodelado vascular en respuesta al daño mecánico

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de NOR-1 en la formación de neointima inducida por lesión vascular, realizamos ensayos de ligadura de la arteria carótida en ratones normales y transgénicos. En relación con los ratones normales, los ratones transgénicos mostraron un remodelado vascular más acentuado, caracterizado por una mayor formación de neointima (fig. 4A). Los análisis morfométricos mostraron un incremento significativo en el área de la íntima en los vasos procedentes de ratones $TgNOR-1^{+CML}$ y un mayor porcentaje de estenosis que los detectados en los vasos de ratones normales (fig. 4B). De modo similar, en términos absolutos se apreció un mayor número de células positivas a Myh10 (datos no mostrados) y de histona H3 fosforilada en la neointima engrosada de los ratones transgénicos (fig. 4D).

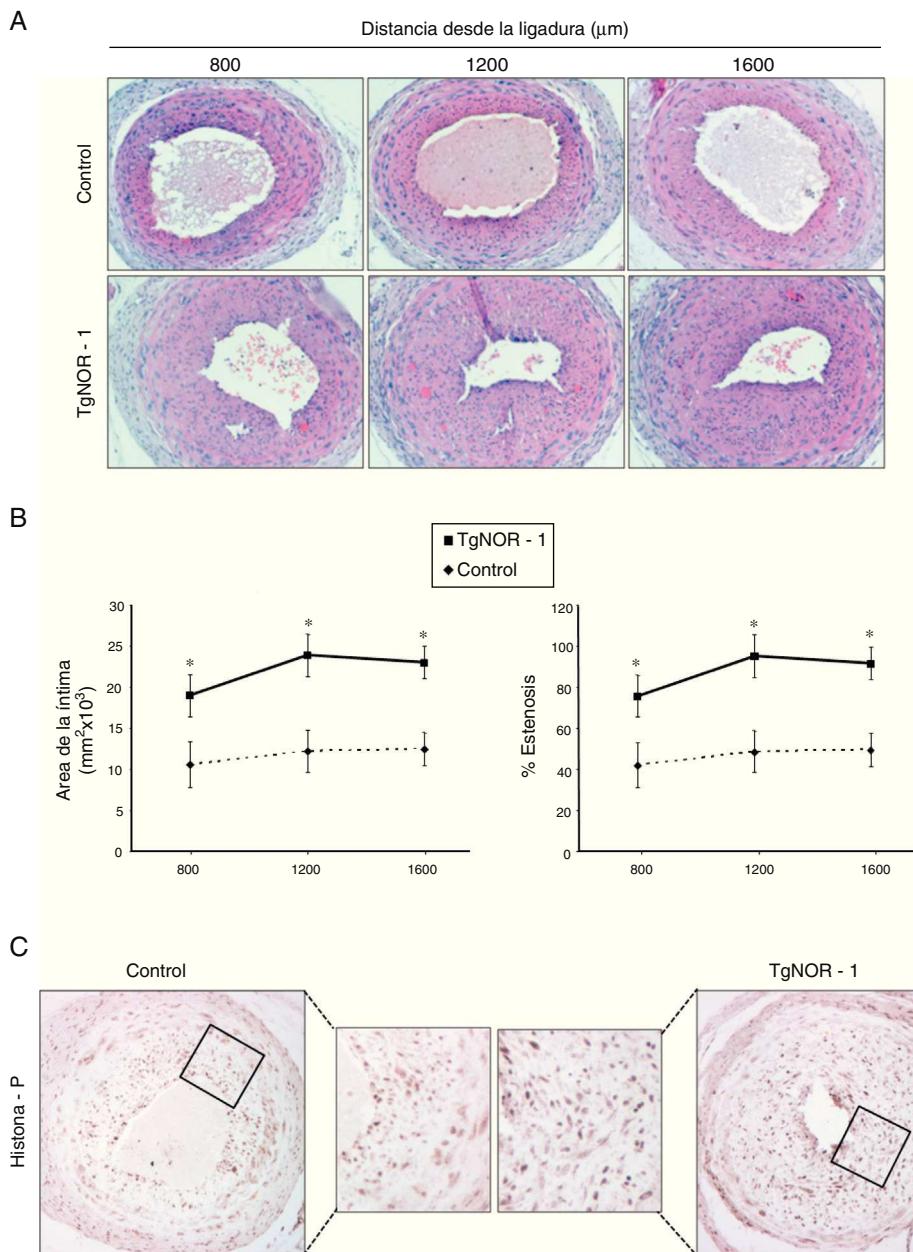


Figura 4 En los animales transgénicos de NOR-1 se exacerba el remodelado vascular inducido mediante ligadura de la arteria carótida. Se realizó una ligadura permanente de la arteria carótida izquierda tanto en animales control como en ratones transgénicos (TgNOR-1). A) Se muestra la tinción con hematoxilina/eosina de secciones de las carótidas ligadas situadas a 800, 1.200 y 1.600 μm del punto de ligadura. B) Cuantificación del área de la capa íntima y del porcentaje de estenosis en estas regiones. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0,01$ vs. control. C) Tinción inmunohistoquímica para la histona H3 fosforilada (histona-P) en secciones de arterias carótidas ligadas procedentes de ratones transgénicos y controles.

Discusión

En el remodelado vascular que subyace al desarrollo de aterosclerosis y de reestenosis tras angioplastia coronaria se han implicado múltiples mediadores, aunque el conocimiento de estos procesos es todavía insuficiente. Estudios previos realizados por nuestro grupo en CMLV en cultivo^{11,17}, así como trabajos del grupo de Bruemmer et al. en ratones deficientes en NOR-1^{12,22}, ponen de manifiesto la relevancia de este receptor nuclear en la regulación de la proliferación

de CMLV. Sin embargo, los estudios con animales modificados genéticamente han dado lugar a resultados contradictorios. Efectivamente, aunque los primeros estudios mostraban que la deficiencia de NOR-1 se asociaba a muerte embrionaria³⁴, posteriormente Nomiyama et al.²² generaron un ratón deficiente en NOR-1 que era viable y que exhibía una menor formación de neointima tras lesión vascular inducida por denudación de la arteria femoral. Sin embargo, en animales transgénicos que expresaban un dominante negativo que suprime la actividad de los 3 receptores se observó

aumento del remodelado vascular tras ligadura de la arteria carótida¹³.

Con el objetivo de esclarecer la contribución de NOR-1 en la activación de las CMLV y en la hiperplasia de la íntima hemos generado un ratón transgénico que sobreexpresa NOR-1 humano en CMLV. Para ello, la secuencia codificante de NOR-1 fue clonada bajo el control del promotor mínimo de la SM22 α , proteína de 22 kDa expresada de forma exclusiva y abundante en CML de vertebrados adultos y considerada uno de los marcadores más tempranos de la diferenciación de las CML³⁵. La secuencia del promotor de SM22 α utilizada en esta construcción (-591/+62) contiene 2 cajas CARG (CC[A/T]6GG, a 150 y 273 pb del inicio de transcripción) críticas para la transcripción específica de SM22 α en CML^{36,37}. Este promotor ha sido utilizado previamente para la sobreexpresión de proteínas de interés en la pared vascular^{13,38}. Siguiendo esta estrategia, la construcción producida se utilizó para generar un ratón transgénico mediante procedimientos estándar. Nuestros resultados evidencian que la sobreexpresión de NOR-1 dirigida a CML no altera el desarrollo embrionario ni la viabilidad de los animales; de hecho, los animales TgNOR-1^{+CML} no mostraron diferencias fenotípicas evidentes respecto a los animales normales. Tras la purificación del fondo genético y la obtención de una línea animal estable, los análisis inmunohistoquímicos, inmunocitoquímicos y de Western-blot confirmaron la mayor expresión de NOR-1 en las CMLV procedentes de los ratones transgénicos. También se corroboró la correcta localización nuclear de la proteína sobreexpresada. Cabe destacar que las CMLV de los ratones transgénicos exhibían una elevada tasa proliferativa y niveles elevados de un marcador del fenotipo sintético de CMLV que se induce durante la proliferación (Myh10)³³. Asimismo, estudios de transfección transitoria permitieron mostrar que las CMLV de los animales transgénicos presentaban un incremento en la actividad del promotor de la ciclina D2, gen diana de los receptores NR4A. Este resultado confirmó la correcta funcionalidad de la proteína NOR-1 sobreexpresada en estas células. En conjunto, estos datos indican que NOR-1 regula positivamente la actividad mitogénica de las CMLV, lo que confirma y amplía nuestros trabajos previos que demostraban que al inhibir NOR-1 se atenuaba la actividad proliferativa de las CMLV^{7,12}.

En el modelo de ligadura de la arteria carótida se produce una respuesta inflamatoria inicial en la que se inducen genes típicos de inflamación², pero sobre todo se caracteriza porque en fases más avanzadas se desencadena una exacerbada respuesta proliferativa de las CMLV y un engrosamiento de la íntima. Los receptores nucleares de la familia NR4A son reguladores clave en el control de la expresión de genes implicados en la proliferación celular y recientemente se ha observado que pueden modular de forma secundaria (a través de la interferencia de la vía de NF κ B) la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria³⁹. Por ello, este modelo se utilizó para evaluar cómo repercute la ganancia de función de NOR-1 sobre el remodelado vascular. La ligadura de la arteria carótida indujo un incremento del área de la íntima y un grado de estenosis superior en los ratones transgénicos que en los controles. Los resultados obtenidos en este estudio refuerzan los descritos por Nomiyama et al.²², que sugerían la contribución de NOR-1 en el engrosamiento de la neointima inducida por lesión mecánica. Además, estos datos ponen de manifiesto la diferente

función de los miembros NR4A en el remodelado vascular. Aunque Nurr1 y Nur77 son inducidos en células vasculares por estímulos similares a NOR-1, estos receptores parecen limitar la proliferación celular y atenúan la formación de neointima después de lesión vascular^{13,14,40,41}.

En conclusión, en este trabajo hemos generado un nuevo modelo de ratón que sobreexpresa NOR-1 humano en CML. La sobreexpresión de NOR-1 en CMLV da lugar a una proteína funcional que induce la actividad mitogénica de estas células y exacerba la formación de neointima en respuesta a lesión vascular mecánica. Aunque son necesarios nuevos estudios que esclarezcan los mecanismos moleculares implicados en la regulación del remodelado vascular por NOR-1, los datos mostrados en este trabajo sugieren que el ratón transgénico para NOR-1 dirigido a CMLV puede ser útil para establecer el papel de este receptor nuclear en el control de la activación de las CMLV, en la función vascular y su implicación en enfermedades como la arteriosclerosis y la reestenosis.

Financiación

Este estudio ha sido financiado por la Fundación Española de Aterosclerosis/Sociedad Española de Arteriosclerosis (Beca SEA/FEA para Investigación Básica 2010), y por los proyectos SAF2012-40127, PI12/01952 y la Red de Investigación Cardiovascular (RD12/00420/0053) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA). Ricardo Rodríguez-Calvo ha sido financiado por un contrato Juan de la Cierva del MINECO, Judith Alonso ha sido financiada por una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación, y Beatriz Ferrán por una beca JAE-Pre del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Agradecemos al Prof. Naganari Ohkura y al Prof. Eric Olson por la amable cesión del ADNc de NOR-1 humano y el promotor de SM22 α , respectivamente. Los autores agradecen la asistencia técnica de Silvia Aguiló y Marta Sanz.

Bibliografía

1. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233–41.
2. Toutouzas K, Colombo A, Stefanidis C. Inflammation and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J*. 2004;25:1679–87.
3. Kumar MS, Owens GK. Combinatorial control of smooth muscle-specific gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:737–47.
4. Andres V. Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*. 2004;63:11–21.
5. Hsueh WA, Bruemmer D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: Implications for cardiovascular disease. *Hypertension*. 2004;43:297–305.
6. Laffitte BA, Tontonoz P. Orphan nuclear receptors find a home in the arterial wall. *Curr Atheroscler Rep*. 2002;4:213–21.
7. Martinez-Gonzalez J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: New early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res*. 2005;65:609–18.
8. Bonta PI, Pols TW, de Vries CJ. NR4A nuclear receptors in atherosclerosis and vein-graft disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;17:105–11.
9. Zhao Y, Bruemmer D. NR4A orphan nuclear receptors in cardiovascular biology. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2009;6:e43–8.
10. Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*. 2003;423:555–60.
11. Martinez-Gonzalez J, Rius J, Castello A, Cases-Langhoff C, Badimon L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*. 2003;92:96–103.
12. Nomiyama T, Nakamachi T, Gizard F, Heywood EB, Jones KL, Ohkura N, et al. The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*. 2006;281:33467–76.
13. Arkenbout K, de Waard V, van Bragt M, van Achterberg T, Grimbberg J, Pichon B, et al. Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: Decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation*. 2002;106:1530–5.
14. Arkenbout EK, van Bragt M, Eldering E, van Bree C, Grimbberg JM, Quax PH, et al. TR3 orphan receptor is expressed in vascular endothelial cells and mediates cell cycle arrest. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1535–40.
15. Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, Pols TW, van Thienen JV, Ferreira V, et al. Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2288–94.
16. Zhao Y, Howatt DA, Gizard F, Nomiyama T, Findeisen HM, Heywood EB, et al. Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 decreases monocyte adhesion and atherosclerosis. *Circ Res*. 2010;107:501–11.
17. Rius J, Martinez-Gonzalez J, Crespo J, Badimon L. Involvement of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: Role of CREB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:697–702.
18. Crespo J, Martinez-Gonzalez J, Rius J, Badimon L. Simvastatin inhibits NOR-1 expression induced by hyperlipemia by interfering with CREB activation. *Cardiovasc Res*. 2005;67:333–41.
19. Liu D, Jia H, Holmes DI, Stannard A, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:2002–7.
20. Rius J, Martinez-Gonzalez J, Crespo J, Badimon L. NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth. *Atherosclerosis*. 2006;184:276–82.
21. Martorell L, Martínez-González J, Crespo J, Calvayrac O, Badimon L. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) is induced by thrombin and mediates vascular endothelial cell growth. *J Thromb Haemost*. 2007;5:1766–73.
22. Nomiyama T, Zhao Y, Gizard F, Findeisen HM, Heywood EB, Jones KL, et al. Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury. *Circulation*. 2009;119:577–86.
23. Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFIB family. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1308:205–14.
24. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.
25. Churchman AT, Siow RC. Isolation, culture and characterisation of vascular smooth muscle cells. *Methods Mol Biol*. 2009;467:127–38.
26. Guadall A, Orriols M, Rodriguez-Calvo R, Calvayrac O, Crespo J, Aledo R, et al. Fibulin-5 is up-regulated by hypoxia in endothelial cells through a HIF-1 α dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2011;286:7093–103.
27. Fuster JJ, González-Navarro H, Vinué A, Molina-Sánchez P, Andrés-Manzano MJ, Nakayama KI, et al. Deficient p27 phosphorylation at serine 10 increases macrophage foam cell formation and aggravates atherosclerosis through a proliferation-independent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2455–63.
28. García-Ramírez M, Martínez-González J, Juan-Babot JO, Rodríguez C, Badimon L. Transcription factor SOX18 is expressed in human coronary atherosclerotic lesions and regulates DNA synthesis and vascular cell growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2398–403.
29. Martorell L, Gentile M, Rius J, Rodriguez C, Crespo J, Badimon L, et al. The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2009;29:5828–42.
30. Martinez-Gonzalez J, Vinals M, Vidal F, Llorente-Cortes V, Badimon L. Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signalling in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1997;135:213–23.
31. Zhang LN, Wilson DW, da Cunha V, Sullivan ME, Vergona R, Rutledge JC, et al. Endothelial NO synthase deficiency promotes smooth muscle progenitor cells in association with upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha in a mouse model of carotid artery ligation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:765–72.
32. Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2238–44.
33. Rensen SS, Doevedans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*. 2007;15:100–8.
34. DeYoung RA, Baker JC, Cado D, Winoto A. The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis. *J Biol Chem*. 2003;278:47104–9.
35. Assinder SJ, Stanton JA, Prasad PD. Transgelin: An actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:482–6.
36. Solway J, Seltzer J, Samaha FF, Kim S, Alger LE, Niu Q, et al. Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22 alpha. *J Biol Chem*. 1995;270:13460–9.

37. Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res.* 1996;78:188–95.
38. Kakkar R, Ye B, Stoller DA, Smelley M, Shi NQ, Galles K, et al. Spontaneous coronary vasospasm in KATP mutant mice arises from a smooth muscle-extrinsic process. *Circ Res.* 2006;98:682–9.
39. McMorrow JP, Murphy EP. Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors. *Biochem Soc Trans.* 2011;39:688–93.
40. Pires NM, Pols TW, de Vries MR, van Tiel CM, Bonta PI, Vos M, et al. Activation of nuclear receptor Nur77 by 6-mercaptopurine protects against neointima formation. *Circulation.* 2007;115:493–500.
41. Bonta PI, Pols TW, van Tiel CM, Vos M, Arkenbout EK, Rohlena J, et al. Nuclear receptor Nurr1 is expressed in and is associated with human restenosis and inhibits vascular lesion formation in mice involving inhibition of smooth muscle cell proliferation and inflammation. *Circulation.* 2010;121:2023–32.