

CLÍNICA E INVESTIGACIÓN EN ARTERIOSCLEROSIS

www.elsevier.es/arterio



ORIGINAL

La atorvastatina inhibe la progresión de la lesión aterosclerótica inducida por el factor inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral en ratones deficientes en apolipoproteína E



Valvanera Fernández-Laso, Cristina Sastre, Jesús Egido,
Jose L. Martín-Ventura y Luis M. Blanco-Colio*

Laboratorio de Patología Vascular, Instituto de Investigación Sanitaria (ISS)-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España

Recibido el 27 de marzo de 2014; aceptado el 29 de abril de 2014

Disponible en Internet el 12 de julio de 2014

PALABRAS CLAVE

Aterosclerosis;
Factor inductor débil
de apoptosis similar
al factor de necrosis
tumoral;
Atorvastatina;
Inflamación

Resumen

Objetivos: La interacción del factor inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK) con su receptor Fn14 acelera el desarrollo de la lesión aterosclerótica en ratones deficientes en ApoE (ApoE KO). En este trabajo hemos analizado el efecto de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, la atorvastatina, sobre el desarrollo de la lesión aterosclerótica acelerada por TWEAK en ratones ApoE KO.

Materiales y métodos: Se alimentaron ratones ApoE KO de 8 semanas de edad durante 4 semanas con una dieta hiperlipidémica y se aleatorizaron en 3 grupos: ratones tratados i.p. con salino (control), tratados con TWEAK recombinante (10 µg/kg/2 veces a la semana) o tratados con TWEAK recombinante más atorvastatina (1 mg/kg/día) durante 4 semanas más. Se analizó el tamaño, la composición celular, la respuesta inflamatoria y la expresión de Fn14 en las lesiones ateroscleróticas presentes en la raíz aórtica de los ratones.

Resultados: La inyección sistémica de TWEAK aumentó el tamaño de la lesión y el cociente colágeno/lípidos así como la respuesta inflamatoria asociada a un aumento en la actividad de NF-κB, expresión de MCP-1 y RANTES y a una mayor presencia de macrófagos en las placas ateroscleróticas de ratones ApoE KO. El tratamiento con atorvastatina fue capaz de prevenir los cambios inducidos por TWEAK en las lesiones ateroscleróticas. Finalmente, el tratamiento con atorvastatina disminuyó la expresión de Fn14 en las lesiones ateroscleróticas de ratones ApoE KO.

Conclusiones: La atorvastatina previene los efectos proaterogénicos inducidos por TWEAK en el ratón ApoE KO, efecto relacionado con la inhibición de la expresión de Fn14.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lblanco@fjd.es (L.M. Blanco-Colio).

KEYWORDS

Atherosclerosis,
Tumor necrosis
factor-like weak
inducer apoptosis;
Atorvastatin;
Inflammation

Estos resultados aportan nueva información sobre los efectos beneficiosos de las estatinas en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

© 2014 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Atorvastatin inhibits the atherosclerotic lesion induced by tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis in apolipoprotein E deficient mice

Abstract

Aim: Interaction of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) with its receptor Fn14 accelerates atherosclerotic plaque development in ApoE deficient mice (ApoE KO). In this work, an analysis has been made on the effect of an HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, on atherosclerotic plaque development accelerated by TWEAK in ApoE KO mice.

Materials and methods: Eight week-old ApoE KO mice were fed with a high cholesterol diet for 4 weeks. The animals were then randomized into 3 groups: mice injected i.p. with saline, recombinant TWEAK (10 µg/kg/twice a week), or recombinant TWEAK plus atorvastatin (1 mg/kg/day) for 4 weeks. The lesion size, cellular composition, lipid and collagen content were analyzed, as well as inflammatory response in atherosclerotic plaques present in aortic root of mice.

Results: TWEAK treated mice showed an increase in atherosclerotic plaque size, as well as in collagen/lipid ratio compared with control mice. In addition, macrophage content, MCP-1 and RANTES expression, and NF-κB activation were augmented in atherosclerotic plaques present in aortic root of TWEAK treated mice compared with control mice. Treatment with atorvastatin prevented all these changes induced by TWEAK in atherosclerotic lesions. Atorvastatin treatment also decreased Fn14 expression in the atherosclerotic plaques of ApoE KO mice.

Conclusions: Atorvastatin prevents the pro-atherogenic effects induced by TWEAK in ApoE KO mice, which could be related to the inhibition of Fn14 expression. The results of this study provide new information on the beneficial effects of statin treatment in cardiovascular diseases.

© 2014 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La aterosclerosis se define actualmente como una enfermedad inflamatoria dado que los principales componentes de la respuesta inflamatoria crónica están presentes durante el desarrollo de la placa de ateroma: reclutamiento celular, proliferación, neovascularización y esclerosis¹. Las lesiones vasculares son causadas por una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa en respuesta al daño. La interacción entre los ligandos de la superfamilia del factor de necrosis tumoral y sus receptores da lugar a diferentes respuestas biológicas que participan en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Entre otras, los miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral incrementan la expresión de moléculas de adhesión, citocinas proinflamatorias, metaloproteinasas de matriz y factor tisular, los cuales favorecen la desestabilización de la placa aterosclerótica. En este sentido, el factor inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK) es una citocina proinflamatoria perteneciente a esta superfamilia que, a través de su único receptor funcional Fn14, está implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos dependiendo del tipo celular y del ambiente². Dentro de la vasculatura, TWEAK se expresa en la pared arterial sana^{3,4} mientras que la expresión de Fn14 es prácticamente ausente⁴. Sin embargo, tanto TWEAK como Fn14 se expresan abundantemente en

la lesión aterosclerótica humana colocalizando con células de músculo liso vascular (CML) y macrófagos⁴. El eje TWEAK/Fn14 está implicado en diferentes procesos asociados al desarrollo y progresión de la lesión vascular como la inflamación⁵, proliferación y migración de CML⁶, trombosis⁷ y angiogénesis^{6,7}. En este sentido, se ha demostrado que la inyección sistémica y aguda (9 días) de TWEAK en ratones deficientes en la apolipoproteína E (ApoE KO) acelera el desarrollo de la lesión aterosclerótica⁸. Además, la inhibición de Fn14 mediante el empleo de una proteína de fusión Fn14-Fc reduce el tamaño de la lesión aterosclerótica en el ratón ApoE KO⁹. Finalmente, la delección génica o el tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti-TWEAK reduce la respuesta inflamatoria así como el tamaño de las lesiones y la carga aterosclerótica en ratones ApoE KO, además de alterar la composición morfológica de la placa hacia un fenotipo más estable¹⁰.

Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de la hidroximetilglutaril CoA (HMG-CoA) reductasa o estatinas reduce el riesgo de sufrir un evento cardiovascular¹¹. Aunque los efectos beneficiosos de estos fármacos se relacionan con su acción hipolipidemiante, distintas líneas de evidencia han sugerido la existencia de diversos efectos beneficiosos sobre la pared vascular más allá de la reducción lipídica observada tras su uso¹². Hemos demostrado que el tratamiento con atorvastatina

disminuye la expresión de Fn14 en CML humanas en cultivo³. Sin embargo, el efecto de las estatinas sobre los efectos proaterogénicos de la interacción TWEAK/Fn14 *in vivo* se desconoce. En este trabajo hemos analizado el efecto de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, la atorvastatina, sobre el desarrollo, la morfología y la respuesta inflamatoria acelerada por TWEAK en la lesión aterosclerótica de ratones ApoE KO.

Materiales y métodos

Modelo animal

Quince ratones machos ApoE KO (Jackson Laboratories) de 8 semanas de edad se alimentaron con una dieta hiperlipidémica (21,2% grasa [0,15% colesterol] + 16,7% proteínas) durante 4 semanas. Los animales se aleatorizaron en 3 grupos: ratones tratados i.p. con salino (control; n = 5), tratados con TWEAK recombinante (rTWEAK) (10 µg/kg/2 veces a la semana; n = 5) o tratados con rTWEAK más atorvastatina (1 mg/kg/día; n = 5) durante 4 semanas más (fig. 1A). La dosis de TWEAK se eligió basándonos en estudios *in vivo* previos⁸. En el momento del sacrificio, todos los animales se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (15 mg/kg) y se tomaron muestras de sangre a partir del plexo orbital, tras lo cual se expuso la cavidad abdominal y se canuló el corazón por el ventrículo izquierdo para la perfusión con suero salino. Posteriormente se extirpó la aorta y se incluyó la región cercana al corazón en Tissu-tek OCT (Sakura) para su posterior estudio histológico. El estudio se realizó siguiendo las directrices de la Unión Europea y fue aprobado por el comité ético del IIS-FJD.

Los niveles séricos de colesterol y de triglicéridos se midieron con kits de Thermo Trance y Abcam, respectivamente.

Análisis morfométrico del seno aórtico

Se diseccionó la parte superior del corazón y se congeló en OCT. Las válvulas aórticas se cortaron en secciones de 5 micras empezando por la sección del corazón en donde se observa por primera vez la presencia de las válvulas en el sitio de unión a la aorta. Los cortes resultantes se tiñeron con *Oil Red-O* (Sigma-Aldrich) y hematoxilina (Dako) a intervalos de 100 micras desde el punto cero hasta llegar a las 1.000 micras del punto de inicio. Se calculó el área de máxima lesión de cada ratón a partir de la media de los 3 cortes con mayor lesión, y las áreas de máxima lesión individual se promediaron para determinar el área de máxima lesión para cada grupo. Para evaluar la cantidad de colágeno presente en las placas, los senos aórticos se tiñeron con *Sirius Red* (Sigma-Aldrich) y medimos la birrefringencia a la luz polarizada.

Análisis inmunohistoquímico

Las muestras incluidas en OCT se fijaron con acetona fría durante 10 min. La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió sumergiendo los cortes en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol-agua (1:1) durante 30 min y posteriormente se incubaron con PBS al 6% de albúmina de suero bovino durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas. Los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios fueron: el marcador de macrófagos CD68 (Abcam), el marcador de músculo liso α -actina (Clone 1A4; Sigma), las citocinas MCP-1 (sc-1785; Santa Cruz Biotechnology) y RANTES (AB2109P, Chemicon) y anti-Fn14 (4403, Cell Signaling Technology).

Los anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes se aplicaron durante 1 h a temperatura ambiente a una dilución 1:200 en PBS al 6% albúmina de suero

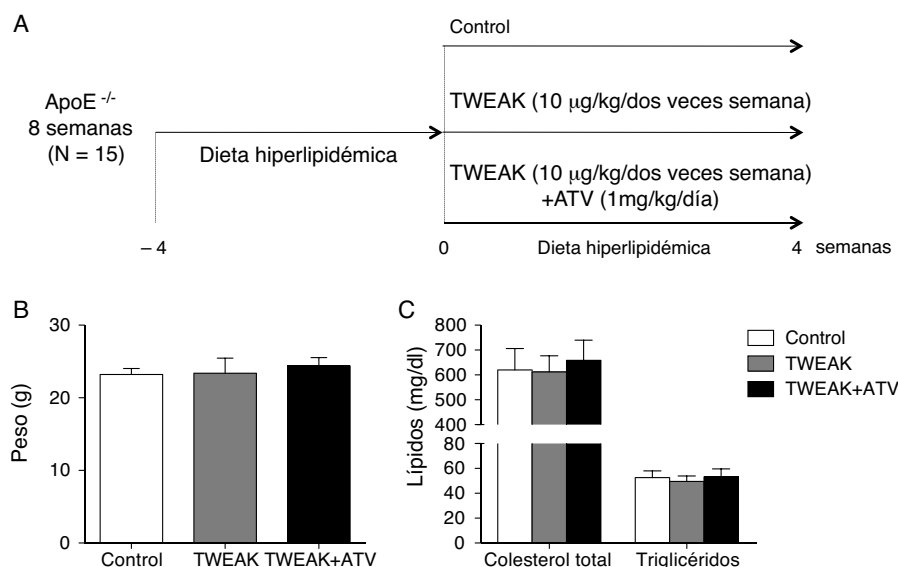


Figura 1 La administración de atorvastatina y/o TWEAK no modifica los parámetros metabólicos en el ratón. A) Representación esquemática del modelo experimental. B y C) Cuantificación del peso y niveles de colesterol y triglicéridos en los diferentes grupos de animales incluidos en el estudio.

bovino. Después se incubaron las muestras con el complejo ABCComplex/HRP (Vector Laboratories) durante 30 min. La localización del anticuerpo se determinó mediante la adición del cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Dako) durante 3-10 min. Por último, se aplicó a las secciones una tinción de fondo con hematoxilina (Dako). Los cortes se montaron directamente con gelatina glicerilada Kaiser (Merck). En cada experimento se realizaron controles negativos con una IgG inespecífica.

Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas

Los análisis morfométricos asistidos por ordenador se realizaron con el software Image-Pro Plus (versión 1.0 para Windows). El umbral para la medición del área teñida fue el mismo para todas las imágenes. Las muestras de cada ratón se examinaron de forma ciega. Los resultados de lípidos, colágeno, MCP-1, RANTES, CD68 y α -actina se expresaron como porcentaje de área positiva respecto al área total.

SouthWestern

Esta técnica se desarrolló para detectar *in situ* la activación de factores de transcripción¹³. En primer lugar se marcó con digoxigenina un oligonucleótido consenso para NF κ B procedente del promotor de RANTES(5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3') (Promega) mediante el empleo de una transferasa 3'-terminal (Roche). Las secciones de tejido incluidas en OCT se fijaron en paraformaldehído al 0,5% y después se trataron secuencialmente con 5 mM de levamisol en PBS y 0,1 mg/mL de DNasa I (Roche). La unión al ADN se realizó mediante la incubación con 50 pmol de sonda de ADN marcada en un *buffer* con 0,25% de albúmina de suero bovino y 1 g/ml de poly (dl-dC). Posteriormente las secciones se incubaron con un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y el sustrato NBT/BCIP (Roche). La detección colorimétrica se realizó según el protocolo. Como control negativo se utilizaron secciones incubadas sin sonda y se utilizó un exceso de sonda sin marcar para testar la especificidad de la técnica. Los resultados se expresan como el porcentaje del área positiva vs. el área total.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el software estadístico SPSS 11.0. Los datos se expresan como la media $\pm$ el error estándar de la media (EEM). Las diferencias entre grupos se determinaron usando un test de Mann-Whitney. Se estableció un valor máximo de probabilidad del 0,05 para ser estadísticamente significativo.

Resultados

La atorvastatina previene el aumento del tamaño de la lesión y la disminución del cociente colágeno/lípidos en ratones ApoE KO tratados con TWEAK

Previamente, nuestro grupo ha demostrado que la inyección sistémica de TWEAK es capaz de aumentar el tamaño de la lesión aterosclerótica presente en la raíz aórtica de ratones ApoE KO. Para determinar si el tratamiento con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, la atorvastatina, es capaz de modular este efecto de TWEAK, ratones ApoE KO de 8 semanas de edad se alimentaron con una dieta hiperlipidémica durante 4 semanas y se aleatorizaron en 3 grupos: ratones tratados con salino, rTWEAK (10 μ g/kg/2 veces a la semana) y tratados con rTWEAK más atorvastatina (1 mg/kg/día) durante 4 semanas (fig. 1A). No se observaron diferencias significativas en el peso o en los niveles de lípidos circulantes al final del estudio entre ninguno de los grupos analizados (fig. 1B-C).

Los animales tratados con rTWEAK presentaron un aumento en el tamaño de las lesiones ateroscleróticas presentes en el seno aórtico comparado con los animales control ($334 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ vs. $202 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; respectivamente; $p < 0,01$) (fig. 2A-C). Por el contrario, el tratamiento con atorvastatina disminuyó significativamente el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en comparación con los ratones tratados con rTWEAK ($189 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ vs. $334 \times 10^3 \mu\text{m}^2$; respectivamente; $p < 0,01$) (fig. 2A-C).

Mientras los depósitos lipídicos hacen que la placa aterosclerótica sea más propensa a la rotura, las fibras de colágeno la estabilizan¹⁴. Por este motivo, hemos analizado el contenido de lípidos y de colágeno mediante la tinción de *Oil red* y de *Sirius red*, respectivamente. Los animales tratados con rTWEAK presentaron un aumento del 56% en la cantidad de lípidos presentes en las lesiones ateroscleróticas de la raíz aórtica en comparación con los animales control ($p < 0,05$; fig. 2A, 3B). No se observaron cambios en el contenido de colágeno entre los ratones tratados con rTWEAK y los controles (fig. 3A-B). Como consecuencia, el cociente colágeno/lípidos, un marcador de estabilidad de la lesión aterosclerótica, disminuyó en los ratones tratados con rTWEAK respecto a los controles ($p < 0,05$; fig. 3C). Sin embargo, los ratones tratados con rTWEAK y atorvastatina presentaron una reducción del 48% en el contenido de lípidos presente en las lesiones ateroscleróticas comparados con los tratados únicamente con rTWEAK ($p < 0,05$; fig. 3B). No se observaron cambios en el contenido de colágeno entre los ratones tratados con rTWEAK y atorvastatina y los tratados únicamente con rTWEAK (fig. 3A-B). Como consecuencia, el cociente colágeno/lípidos aumentó en los ratones tratados con rTWEAK y atorvastatina respecto a los tratados solo con rTWEAK ($p < 0,05$; fig. 3C). No se observaron diferencias entre los ratones tratados con atorvastatina y los controles en ninguno de los diferentes parámetros analizados (fig. 3B-C).

La atorvastatina previene el incremento del infiltrado de macrófagos en la lesión aterosclerótica de ratones ApoE KO tratados con TWEAK

La inflamación tiene un gran impacto en la vulnerabilidad de la placa de ateroma¹⁵. Por este motivo, hemos analizado el grado de inflamación, representado como el contenido de macrófagos, en las lesiones ateroscleróticas presentes en la raíz aórtica de los ratones ApoE KO tratados con rTWEAK solo o en combinación con atorvastatina. Los ratones tratados con rTWEAK presentaron un incremento del 125% en el infiltrado macrofagocitario en las lesiones ateroscleróticas del seno aórtico en comparación con los

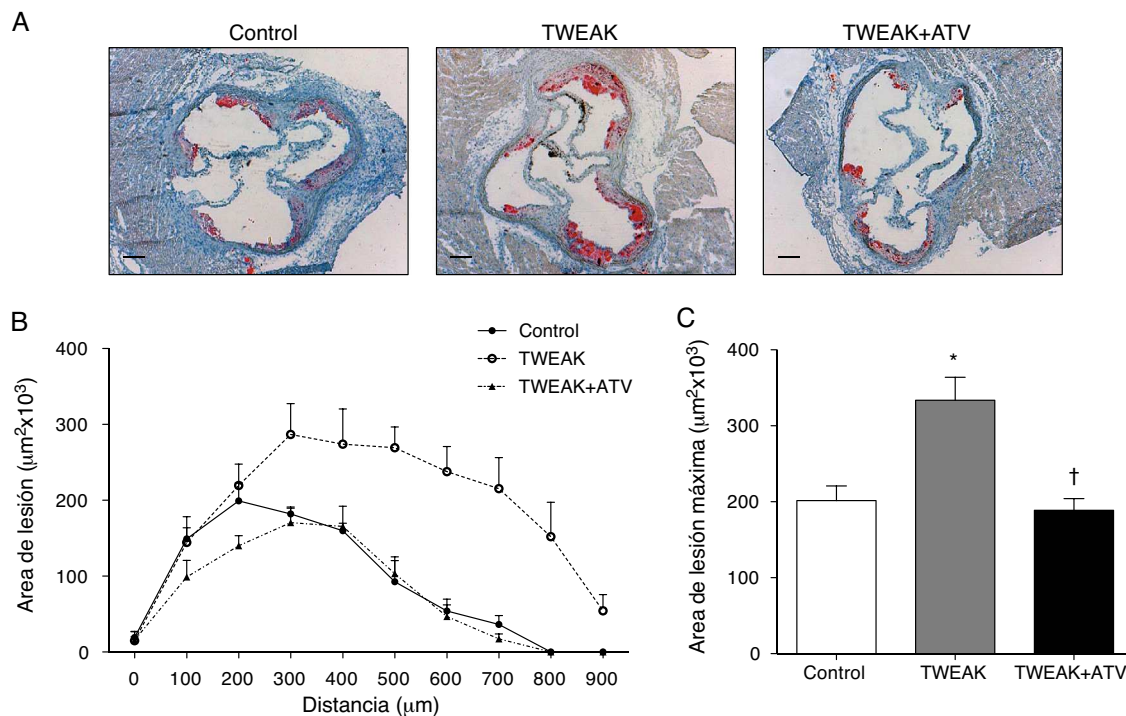


Figura 2 La atorvastatina disminuye la progresión de la lesión aterosclerótica acelerada por TWEAK en ratones deficientes para ApoE. A) Imágenes representativas del seno aórtico teñido con Oil Red y hematoxilina, y B) cuantificación del área de la lesión a lo largo de la raíz aórtica de ratones control o tratados con atorvastatina y/o TWEAK durante 4 semanas. Los valores representan la media $\pm$ EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. Escala, 200 μm . C) Área de la lesión máxima presente en la raíz aórtica de ratones control o tratados con atorvastatina y/o TWEAK durante 4 semanas. Los valores representan la media $\pm$ EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. * $p < 0,01$ vs. control; ** $p < 0,01$ vs. TWEAK.

ratones control ($p < 0,01$; fig. 4A). Además, se observó un 53% de reducción en el contenido de CML en los ratones tratados con rTWEAK con respecto a los controles, aunque no se llegó a la significación estadística (fig. 4B). Sin embargo, los ratones tratados con rTWEAK y atorvastatina mostraron una reducción del 40% en el contenido de macrófagos presente en las lesiones ateroscleróticas comparados con los tratados únicamente con rTWEAK ($p < 0,05$; fig. 4A). Además, el contenido de CML aumentó un 93% en los ratones tratados con atorvastatina en comparación con los tratados únicamente con rTWEAK (fig. 4B), aunque esta diferencia no fue significativa. Como consecuencia, el cociente CML/macrófagos disminuyó en los ratones tratados con rTWEAK ($p < 0,01$ vs. control; no mostrado) y aumentó en las lesiones de los animales tratados con atorvastatina ($p < 0,05$ vs. rTWEAK; no mostrado), indicando la existencia de un fenotipo más estable en las placas ateroscleróticas de estos ratones.

La atorvastatina previene el incremento de la respuesta proinflamatoria en la lesión aterosclerótica de ratones ApoE KO tratados con TWEAK

Para determinar los posibles mecanismos por los cuales TWEAK incrementa el contenido de macrófagos en las lesiones ateroscleróticas, hemos analizado la expresión de 2 citocinas que desempeñan un papel principal en la respuesta proinflamatoria asociada a la progresión de la placa aterosclerótica, MCP-1 y RANTES^{16,17}. La expresión de estas 2 citocinas está regulada por el factor de transcripción

NF- κ B, un factor de transcripción clave en la activación de la respuesta inflamatoria²⁰. El tratamiento con rTWEAK aumentó tanto la actividad de NF- κ B como la expresión de MCP-1 y RANTES en las lesiones ateroscleróticas del seno aórtico en comparación con los ratones control (fig. 5A-B). Sin embargo, los ratones tratados con rTWEAK y atorvastatina presentaron una reducción tanto de la actividad de NF- κ B como de la expresión de MCP-1 y RANTES en las lesiones ateroscleróticas del seno aórtico comparado con los tratados únicamente con rTWEAK (fig. 5A-B). Estos resultados indican que la atorvastatina inhibe la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK en ratones deficientes en ApoE.

La atorvastatina inhibe la expresión de Fn14 en la lesión aterosclerótica de ratones ApoE KO

Previamente hemos demostrado que el tratamiento con atorvastatina disminuye la expresión de Fn14 inducida por citocinas proinflamatorias en CML en cultivo³. Para confirmar este efecto *in vivo*, hemos analizado la expresión de Fn14 en los diferentes grupos incluidos en el estudio. Como se observa en la figura 6, Fn14 se expresa de una manera similar en las lesiones ateroscleróticas presentes en los ratones control y en los tratados con rTWEAK. El tratamiento con atorvastatina disminuyó significativamente la expresión de Fn14 en las lesiones ateroscleróticas presentes en la raíz aórtica en comparación con ratones control o tratados con rTWEAK ($p < 0,001$ para ambos; fig. 6). Estos resultados podrían indicar que el efecto beneficioso observado tras el tratamiento con atorvastatina se debe, al menos

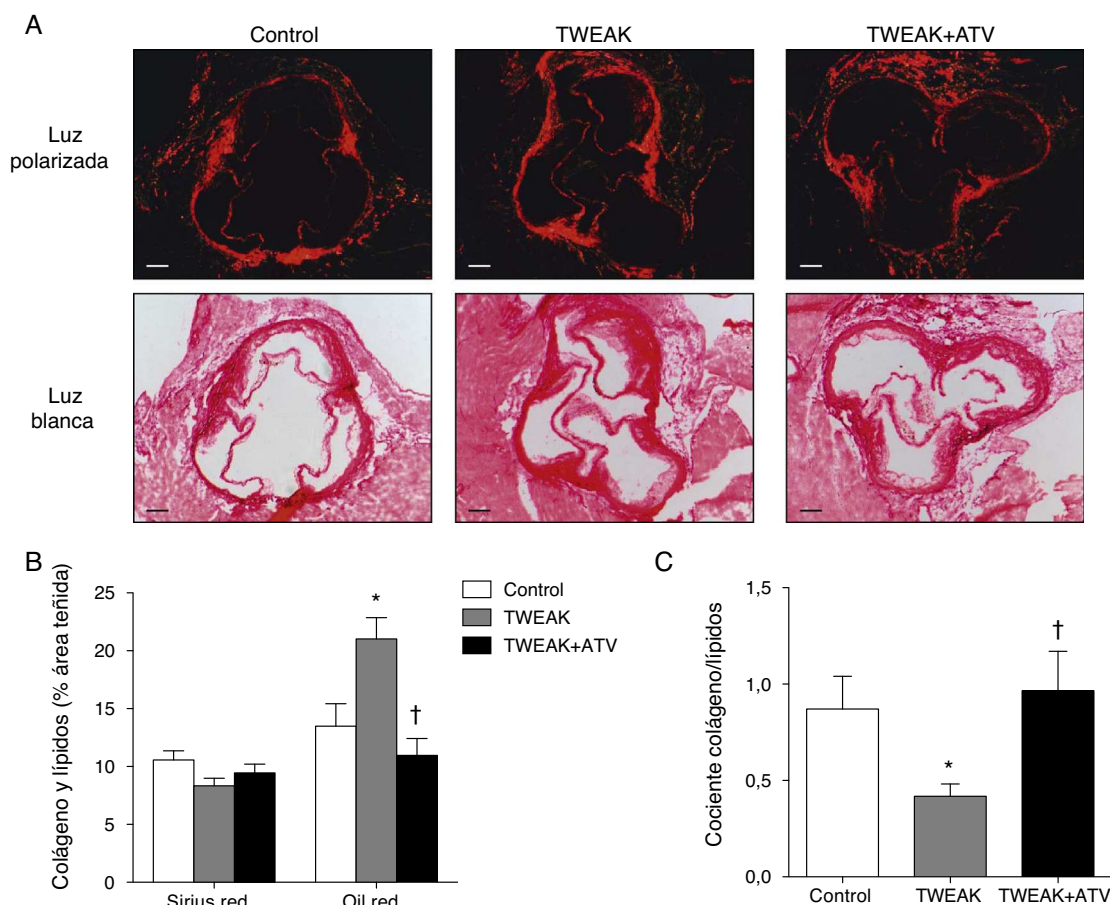


Figura 3 La atorvastatina disminuye el contenido lipídico en la lesión aterosclerótica inducida por TWEAK en ratones deficientes para ApoE. A) Imágenes representativas y B) cuantificación del contenido de colágeno (*Sirius Red*) y de lípidos (*Oil Red-O*) en las lesiones del seno aórtico de ratones control o tratados con atorvastatina y/o TWEAK durante 4 semanas. Los valores representan la media $\pm$ EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. * $p < 0,05$ vs. control; ** $p < 0,01$ vs. TWEAK. Escala, 200 μ m. C) La estabilidad de la placa se analizó mediante el cociente colágeno/lípidos en cada grupo de animales. * $p < 0,05$ vs. control; ** $p < 0,05$ vs TWEAK.

en parte, a la reducción de la respuesta inflamatoria inducida por la interacción entre TWEAK y su receptor funcional Fn14.

Discusión

Diferentes estudios han demostrado que el uso de estatinas es beneficioso tanto en prevención primaria como secundaria para el tratamiento de enfermedad coronaria^{11,18,19}. En los últimos años se han mostrado diferentes efectos de las estatinas independientes de la disminución en los niveles circulantes de LDL^{12,20}. Así, estudios recientes indican que algunos de los llamados efectos pleiotrópicos de las estatinas implican la mejora de la función endotelial, el aumento de la estabilidad de la lesión aterosclerótica, la disminución del estrés oxidativo así como la disminución de la respuesta inflamatoria y protrombótica²¹.

En este trabajo describimos un nuevo efecto de la atorvastatina, la inhibición de la progresión de la lesión aterosclerótica inducida por TWEAK en ratones ApoE KO. Hemos demostrado cómo la administración sistémica de TWEAK da lugar a un desarrollo acelerado de la placa aterosclerótica,

aumentando la respuesta inflamatoria y dando lugar a un cambio en la estructura morfológica de la lesión hacia un fenotipo más inestable. El tratamiento con atorvastatina fue capaz de revertir los efectos proaterogénicos de TWEAK. La presencia de macrófagos, la expresión de citocinas proinflamatorias y la activación del factor de transcripción NF- κ B disminuyó tras el tratamiento con atorvastatina. Asimismo, el contenido de lípidos y el tamaño de las lesiones presentes en la raíz aórtica fueron menores en los animales tratados con la estatina.

De acuerdo con estudios previos en los que la inyección sistémica y aguda de TWEAK incrementó y el tratamiento con una proteína de fusión Fn14-Fc disminuyó el tamaño de la lesión aterosclerótica en ratones ApoE KO⁸⁻⁹, hemos observado cómo el tratamiento prologando con rTWEAK aumentó el tamaño de la lesión vascular. Sin embargo, la composición de la lesión aterosclerótica es más importante que el grado de estenosis a la hora de determinar su posible rotura y el consiguiente evento isquémico²². Las placas inestables exhiben una sustancial pérdida de CML y colágeno y son ricas en células inflamatorias²³. El tratamiento con rTWEAK provocó un cambio en la composición

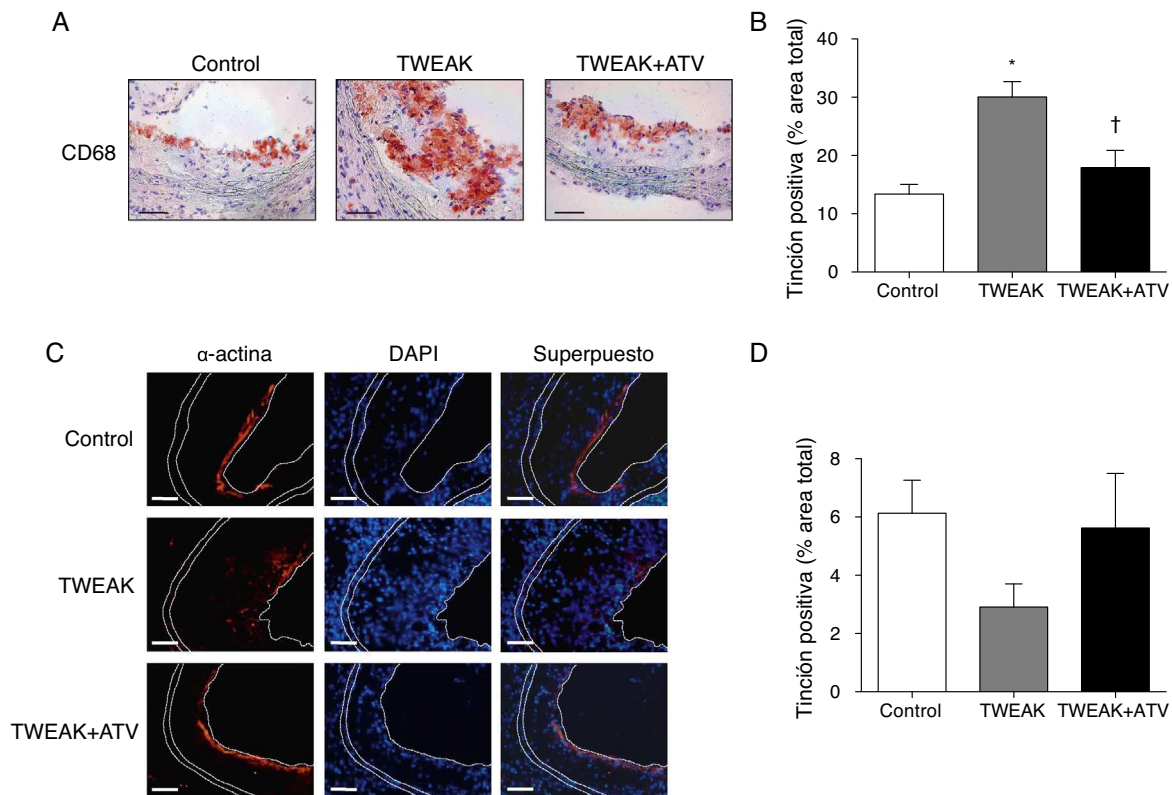


Figura 4 La atorvastatina disminuye la presencia de macrófagos en la lesión aterosclerótica inducida por TWEAK en ratones deficientes para ApoE. Imágenes representativas de inmunohistoquímicas frente a CD68 (macrófagos; A) y α -actina (cél. músculo liso vascular; C) y B-D) cuantificación en las lesiones del seno aórtico en ratones control o tratados con atorvastatina y/o TWEAK durante 4 semanas. Escala, 50 μ m para CD68 y 100 μ m para α -actina. Los valores representan la media $\pm$ EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. * $p < 0,01$ vs. control; ** $p < 0,01$ vs. TWEAK.

celular de las placas ateroscleróticas. Así, la presencia de macrófagos aumentó y se observó una tendencia hacia la disminución en el porcentaje de CML en los ratones tratados con rTWEAK comparado con los controles. Atorvastatina fue capaz de revertir este efecto, disminuyendo el contenido de macrófagos y aumentando el de CML. El mecanismo por el cual TWEAK aumenta el contenido de macrófagos está relacionado con su capacidad de aumentar la expresión de diferentes citocinas proinflamatorias en macrófagos y CML en cultivo incluyendo MCP-1, IL-6, IL-8 y RANTES^{8,24}. La expresión de estas citocinas está bajo el control transcripcional de NF- κ B²⁵. Hemos observado que el tratamiento prolongado con rTWEAK es capaz de aumentar la actividad de NF- κ B y la expresión de citocinas proinflamatorias como MCP-1 y RANTES en las lesiones ateroscleróticas del ratón ApoE KO. Asimismo, atorvastatina fue capaz de disminuir tanto la expresión de citocinas como la actividad de NF- κ B, revirtiendo el fenotipo proinflamatorio inducido por rTWEAK. De hecho, se ha demostrado que la atorvastatina disminuye la activación de NF- κ B inducida por moléculas proinflamatorias en CML en cultivo, efecto relacionado con la capacidad de inhibir a la IKK, cinasa de la subunidad inhibitoria κ B, responsable de la activación de NF- κ B²⁶.

La mayor presencia de macrófagos en las placas tratadas con TWEAK debe estar relacionada con el aumento en la cantidad de lípidos que se observan en las lesiones

ateroscleróticas. Así, se ha demostrado que TWEAK aumenta la absorción de lípidos por macrófagos *in vitro*⁹. Como consecuencia del aumento de lípidos observado en los ratones tratados con rTWEAK, el cociente colágeno/lípidos, un marcador de inestabilidad de la placa aterosclerótica, disminuyó, lo que indica que TWEAK no solo es capaz de modificar la composición de la placa de ateroma sino que además la hace más propensa a la rotura. De nuevo, el tratamiento con atorvastatina fue capaz de disminuir el aumento de lípidos en las lesiones ateroscleróticas y, como consecuencia, aumentar el cociente colágeno/lípidos lo que se tradujo en placas con un fenotipo más estable.

Los efectos observados tras el tratamiento con atorvastatina fueron independientes de su acción hipolipidemiante ya que los niveles séricos de colesterol y triglicéridos no se vieron afectados durante el periodo de estudio. Este resultado está en concordancia con lo observado por otros autores que indican que el tratamiento con estatinas no modifica el perfil lipídico en el ratón ApoE KO^{27,28}. De hecho, hemos observado cómo la expresión del receptor de TWEAK, Fn14, está disminuida en los ratones tratados con atorvastatina, lo que podría indicar un efecto directo de este fármaco sobre el eje TWEAK/Fn14. En este sentido, estudios previos de nuestro grupo demostraron que la atorvastatina disminuye la expresión de Fn14 en CML independientemente de su acción hipolipidemiante³. Este efecto fue dependiente de

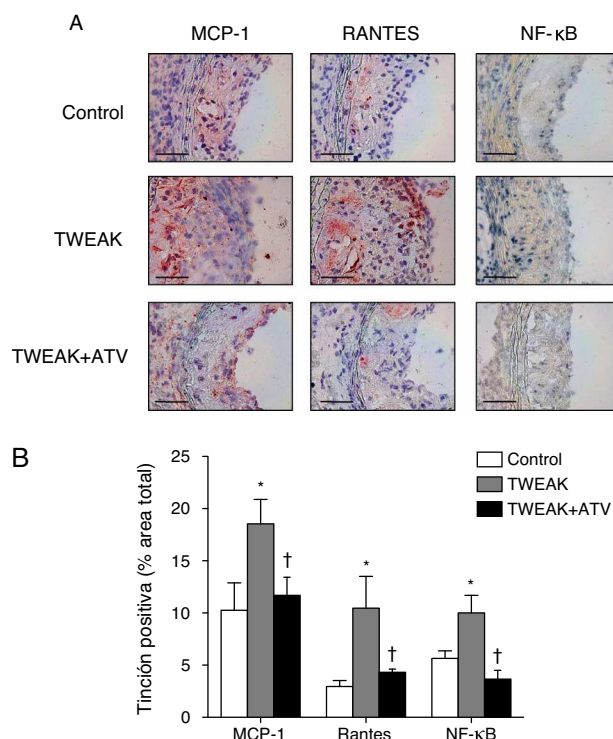


Figura 5 La atorvastatina reduce la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK en las placas ateroscleróticas presentes en ratones deficientes para ApoE. A) Imágenes representativas y B) cuantificación de MCP-1, RANTES y NF-κB en las lesiones del seno aórtico procedente de ratones control o tratados con atorvastatina y/o TWEAK durante 4 semanas. Escala, 50 μ m. Los valores representan la media $\pm$ EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. * $p < 0,01$ vs. control; ** $p < 0,05$ vs. TWEAK.

la isoprenilación proteica y, en particular, de la activación de proteínas G pequeñas de la familia Rho³.

En conclusión, el tratamiento con atorvastatina disminuye la respuesta inflamatoria, el contenido de lípidos y la

progresión de la lesión aterosclerótica inducida por TWEAK en ratones ApoE KO. Estos resultados ponen de manifiesto un nuevo mecanismo beneficioso de acción de las estatinas en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

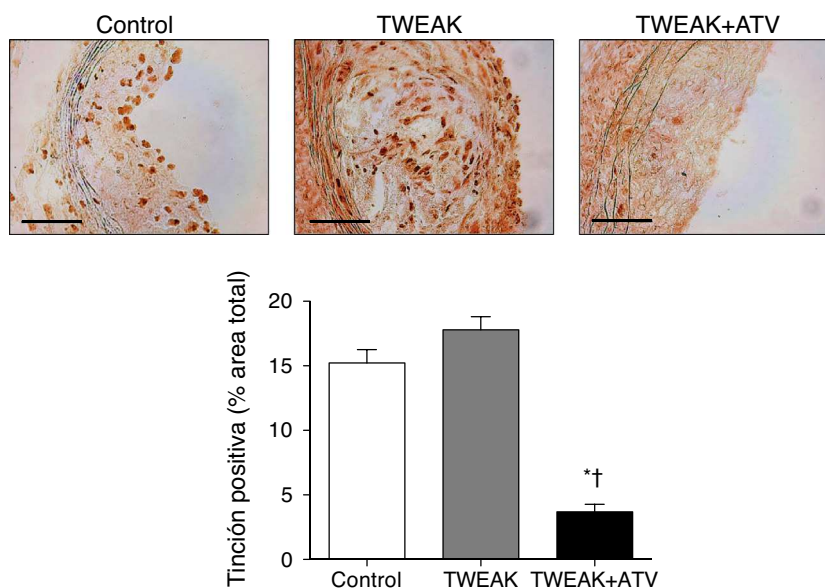


Figura 6 La atorvastatina disminuye la expresión de Fn14 en las placas ateroscleróticas presentes en ratones deficientes para ApoE. A) Imágenes representativas y B) cuantificación de la expresión de Fn14 en las lesiones del seno aórtico procedente de ratones control o tratados con atorvastatina y/o TWEAK durante 4 semanas. Escala, 50 μ m. Los valores representan la media $\pm$ EEM de todos los animales incluidos en cada grupo. * $p < 0,01$ vs. control; ** $p < 0,05$ vs. TWEAK.

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 han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por la Beca FEA/SEA de Investigación Básica 2009 de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, el ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación (PI10/00234, PI13/00395, RETICS RD12/0042/0038) y Pfizer.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Bibliografía

- Hansson GK. Inflammation atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685–95.
- Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine receptor axis: Discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:411–25.
- Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Martínez E, Sánchez S, Hernández G, Ortega L, et al. Fn14 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: Modulation by atorvastatin. *Stroke*. 2006;37:2044–53.
- Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Orbe J, Páramo JA, Michel JB, et al. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 2007;27:916–22.
- Harada N, Nakayama M, Nakano H, Fukuchi Y, Yagita H, Okumura K. Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;299:488–93.
- Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA, Wiley SR. TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem*. 1999;274:8455–9.
- Muñoz-García B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Martín-Ventura JL, López-Franco O, Sastre C. TWEAK-Fn14 interaction enhances plasminogen activator inhibitor 1 and tissue factor expression in atherosclerotic plaques and in cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2011;89:225–33.
- Muñoz-García B, Moreno JA, López-Franco O, Sanz AB, Martín-Ventura JL, Blanco J, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) enhances vascular and renal damage induced by hyperlipidemic diet in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:2061–8.
- Schapiro K, Burkly LC, Zheng TS, Wu P, Groeneweg M, Rousch M, et al. Fn14-Fc fusion protein regulates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and inhibits macrophage lipid uptake in vitro. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 2009;29:2021–7.
- Sastre C, Fernández-Laso V, Madrigal-Matute J, Muñoz-García B, Moreno JA, Pastor-Vargas C, et al. Genetic deletion or TWEAK blocking antibody administration reduce atherosclerosis and enhance plaque stability in mice. *J Cell Mol Med*. 2014;18:721–34.
- Vaughan CJ, Gotto AM. Update of statins: 2003. *Circulation*. 2004;110:886–92.
- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89–118.
- Hernández-Presa MA, Gómez-Guerrero C, Egido J. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int*. 1999;55:209–14.
- Rekhter MD. How to evaluate plaque vulnerability in animal models of atherosclerosis? *Cardiovasc Res*. 2002;54:36–41.
- Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: Novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006;37:1923–32.
- Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17:1410–22.
- Zernecke A, Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2010;86:192–201.
- Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:2057–64.
- Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer Jr HB, Clark LT, Hunninghake DB. A summary of implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1329–30.
- Liao JK. Clinical implications for statin pleiotropy. *Curr Opin Lipidol*. 2005;16:624–9.
- Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: Implications for cardiovascular event reduction. *JAMA*. 1998;279:1643–50.
- Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111:3481–8.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1262–75.
- Kim SH, Kang YJ, Kim WJ, Woo DK, Lee Y, Kim DI, et al. TWEAK can induce pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ J*. 2004;68:396–9.
- De Winther MPJ, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:904–14.
- Ortego M, Gómez-Hernández A, Vidal C, Sánchez-Galán E, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce I kappa B kinase activity induced by oxidative stress in monocytes and vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;45:468–75.
- Wang YX, Martin-McNulty B, Huw LY, da Cunha V, Post J, Hinchman J, et al. Anti-atherosclerotic effect of simvastatin depends on the presence of apolipoprotein E. *Atherosclerosis*. 2002;162:23–31.
- Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:115–21.