

El factor de transcripción kB (NF-kB) y las enfermedades cardiovasculares

J. EGIDO, M. A. HERNÁNDEZ-PRESA, J. TUÑÓN*, L. M. BLANCO-COLIO, M. ORTEGO, Y. SUZUKI, J. J. PLAZA, C. GUIJARRO**

Laboratorio de Investigación Vascular y Departamento de Cardiología*, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma. Fundación Hospital Alcorcón**. Madrid

Los factores de transcripción participan en la regulación de la expresión de los genes. NF-kB es un factor de transcripción usado extensamente, que desempeña un papel fundamental en muchas respuestas celulares a los cambios ambientales. Su activación conduce a la expresión coordinada de varios genes que codifican proteínas, citoquinas, moléculas de adhesión y enzimas, así como otras muchas implicadas en las lesiones cardiovasculares, NO sintetasa, COX2 y factor tisular. El número de mediadores que participan en la patogenia de la aterosclerosis y en otros procesos vasculares que pueden activar a NF-kB está creciendo. En estudios in vitro con cultivos de células endoteliales, células del músculo liso vascular (VSMC) y células mononucleares se ha demostrado que ox-LDL, TNF α , angiotensina II, trombina, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), los proteoglicanos y el estrés oxidativo activan a NF-kB, lo que va seguido de la transcripción de genes regulados, como MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 (los más estudiados). Se ha demostrado recientemente la presencia de NF-kB en lesiones ateroscleróticas experimentales y humanas, y el grado de activación

de NF-kB se correlacionó con el grado de progresión de la aterosclerosis.

Hemos demostrado que tanto los inhibidores de ACE como las estatinas reducen la activación de NF-kB, la expresión de MCP-1, y el contenido de macrófagos en los vasos dañados, lo que confirma los efectos clínicos positivos que ejercen estos fármacos sobre las coronariopatías. NF-kB también parece estar implicado en los episodios que se producen después de la isquemia y reperfusión. Se ha indicado que el NF-kB activado en células mononucleares circulantes es un marcador potencial de la actividad de las enfermedades de las arterias coronarias. Estudios in vivo e in vitro indican que NF-kB desempeña un papel importante en la proliferación de VSMC. Obviamente, NF-kB es un blanco terapéutico en las enfermedades cardiovasculares. Algunos fármacos antiinflamatorios como los esteroides y las aspirinas, e inmunosupresores, como ciclosporina y rapamicina, son inhibidores potentes de NF-kB. Las estatinas modifican la actividad de NF-kB, probablemente reduciendo la isoprenilación de las proteínas G. Los antioxidantes también reducen la activación de NF-

kB. Las estrategias sobre la manipulación del inhibidor de NF- κ B, I κ B, pueden suponer un método terapéuticamente accesible para la supresión transcripcional selectiva de genes que participan en la lesión vascular.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, se han hecho grandes avances en el descubrimiento de los mecanismos que activan y desactivan los genes. De particular interés es un grupo de proteínas, los factores de transcripción, que desempeñan papeles fundamentales en la regulación de la expresión de los genes. En virtud de su capacidad para interactuar con secuencias específicas del ADN (que son únicas para cada factor de transcripción) en las regiones reguladoras de los genes, los factores de transcripción sirven para modificar no

sólo la magnitud de la expresión de los genes, sino también la especificidad de la señal.

Esta especificidad está determinada en parte por la presencia o ausencia de una zona de unión en la región promotora del gen diana. Los factores de transcripción no funcionan aislados. Por el contrario, forman canales reguladores mediante los cuales algunos factores interaccionan para regular la transcripción génica. Incluso en combinaciones sinérgicas, los factores de transcripción no son los únicos responsables de la regulación génica. En este sentido, son muy importantes las señales extracelulares o intracelulares que originan modificaciones en la unión del ADN y en los dominios de transactivación de los factores de transcripción. La fosforilación, que se desencadena por señales bioquímicas de los receptores de superficie celulares, es un medio común para alterar la función de los factores de transcripción. Una descripción más detallada de la regulación de la expresión génica está fuera del alcance de esta revisión, por lo que nos remitimos a otras publicaciones (1, 2).

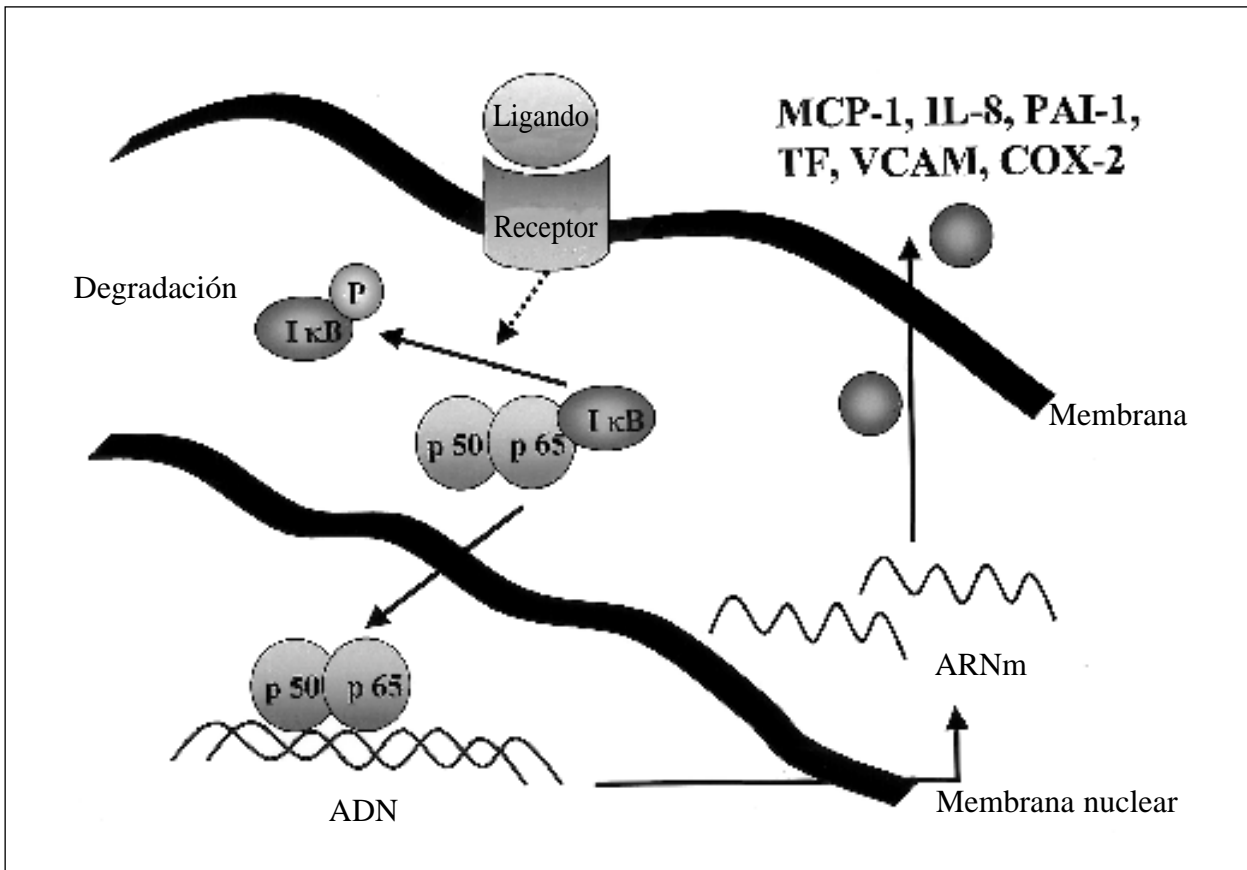


FIG. 1. Esquema de activación de NF- κ B

Un factor de transcripción muy importante, que tiene funciones muy amplias y que desempeña un papel fundamental en muchas respuestas celulares a cambios ambientales, es el factor nuclear κ B (NF- κ B). NF- κ B se identificó como regulador de la expresión del gen de la cadena ligera kappa de los linfocitos B murinos, pero se ha encontrado en muchos tipos de células. La forma activada de NF- κ B es un heterodímero, que generalmente se compone de dos proteínas, las subunidades p65 y p50. En células estimuladas, NF- κ B se encuentra en el citoplasma y está unido a I κ B, lo que le impide penetrar en el núcleo. Cuando estas células se estimulan, diversas quinasas específicas fosforilan I κ B, produciendo su rápida degradación por proteasomas. La disociación de I κ B de NF- κ B origina el paso NF- κ B al núcleo, donde se une a secuencias específicas de las regiones promotoras de los genes diana (3-5) (Figura 1).

NF- κ B se activa por muchos de los factores que participan en la respuesta inflamatoria.

Esta activación, como consecuencia, origina la expresión coordinada de diferentes genes que codifican proteínas, como citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y enzimas implicadas en la iniciación y permanencia de la respuesta inflamatoria (3-6). Está surgiendo actualmente una idea muy atractiva sobre la implicación potencial de la activación de NF- κ B de en la patogenia de las enfermedades cardiovasculares (7). Se ha observado la presencia de zonas de unión de NF- κ B en muchos promotores de genes como MCP-1 e IP-10. MCP-1 puede secretarse por varias células, como las células endoteliales y las células del músculo liso vascular (VSMC) y es mitogénico para VSMC con la estimulación apropiada. IP-10 es una quimiocina C-X-C que atrae a los monocitos y activa a los linfocitos T. También se ha observado su aumento en la arteria carótida de ratas tras angioplastia y su expresión en VSMC cultivadas.

NF- κ B también participa en la respuesta genómica antiapoptótica, aunque siguen sin identificarse los genes

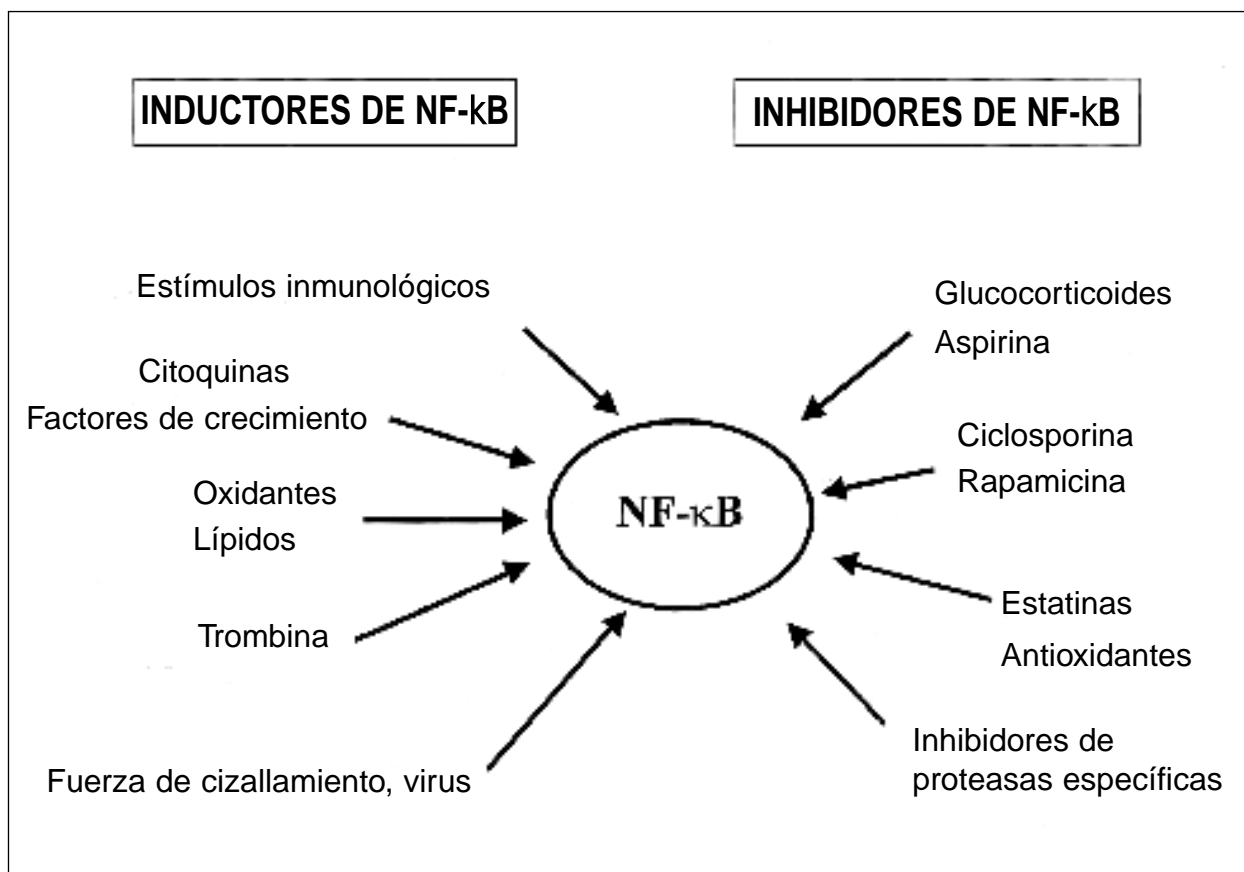


FIG. 2. Inductores e inhibidores de NF- κ B.

antiapoptóticos que activados por NF- κ B en respuesta a estímulos apoptóticos (por ejemplo, TNF α) (8). Debe tenerse en cuenta que el gen I κ B- α en sí tiene una zona κ B y se activa por NF- κ B, lo que lleva a un aumento de la síntesis de I κ B y de la terminación de la activación de NF- κ B. Hay pocas alteraciones en la composición básica de las zonas de NF- κ B y las secuencias que le rodean, y su cooperación con otros factores de transcripción, como la proteína activadora 1 (AP-1) y NF-IL6, pueden deberse a la regulación sutil de genes específicos en distintos tipos de células.

FACTOR NUCLEAR κ B Y ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS VASCULARES

Pruebas *in vitro*

En algunos estudios se ha demostrado que varios inductores conocidos de la activación de NF- κ B también estimulan a este factor de transcripción en células vasculares cultivadas (Figura 2).

Hemos demostrado recientemente que en células del músculo liso vascular y en células mononucleares cultivadas, algunas sustancias que se encuentran frecuentemente en el microambiente de las lesiones ateroscleróticas, como la citoquina TNF α y la sustancia vasoactiva Ang II producen la activación de NF- κ B, compuesto por las dos subunidades p50 y p65, el complejo que participa en la activación, como se comprobó por pruebas de cambio de movilidad electroforética (EMSA) y pruebas de supercambio con anticuerpos frente a p50 y p65.

Los resultados obtenidos con Ang II tuvieron un interés especial. El sistema renina-angiotensina parece desempeñar un papel muy importante en la patogenia de las lesiones vasculares incluida la aterosclerosis. En seres humanos se asoció la sobreexpresión de ACE con mayor riesgo de infarto de miocardio. En modelos experimentales con animales, los inhibidores ACE produjeron una reducción de la formación de neointima tras la lesión vascular, y un efecto beneficioso en la reestenosis. Recientemente nosotros hemos explorado la hipótesis de que Ang II podría ser responsable, al menos en parte, de la acumulación de macrófagos en las arterias dañadas. En VSMC y monocitos cultivados, Ang II produjo una sobreexpresión del gen MCP-1 y

activación de NF- κ B. La preincubación de células con PDTC (un ditiocarbamato con propiedades antioxidantes) abolió la activación de NF- κ B. Los mecanismos por los cuales la angiotensina II desencadena la activación de NF- κ B todavía no están bien definidos. Se sabe que la angiotensina II fosforila algunos factores de transcripción, como la familia STAT y, por tanto, podría también inducir la fosforilación de la molécula inhibidora I κ B. Últimamente se ha comprobado que sustancias oxígeno reactivas intermedias participan en la transcripción extracelular de la señal de angiotensina II. Nuestros datos que demuestran la anulación mediante PDTC de los efectos de angiotensina II están de acuerdo con este mecanismo.

La disfunción endotelial suscitada por oxLDL se ha implicado en la patogenia de la aterosclerosis. Algunos autores han demostrado que oxLDL activan a la NF- κ B de los fibroblastos, y en células endoteliales y VSMC y produce lesión celular (13). Li et al. han demostrado recientemente que en células endoteliales coronarias humanas, oxLDL producen la degradación de I κ B y la activación de NF- κ B, y causa simultáneamente apoptosis en estas células (14). La activación oxidativa de los factores de transcripción de las células endoteliales, especialmente NF- κ B, se ha sugerido como posible mecanismo de iniciación de las lesiones ateroscleróticas. Además, se ha demostrado la activación de NF- κ B en células endoteliales de una placa aterosclerótica precoz (15-17).

La trombina, una proteasa de la serina derivada de la protrombina zimogénica, desempeña un papel fundamental en la hemostasis, y funciona como un agonista de respuestas de varios tipos celulares. Además, algunos estudios han demostrado que la trombina es un regulador importante de la adhesión de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) a las células endoteliales (18). Este aumento de la adhesión endotelial puede deberse a la activación de proteínas adhesivas, como ICAM-1, sobre la superficie de la célula endotelial. Algunos autores han demostrado que la trombina es un inductor potente de IL-1 β , selectina E e ICAM-1 en las células endoteliales. La capacidad de la trombina para activar estos genes se correlaciona con los resultados observados de que la perfusión de trombina produjo secuestro de los PMN en microvasos pulmonares como consecuencia de la unión de los PMN a células del endotelio vascular. Sin embargo,

los mecanismos de este efecto no se han definido bien. Recientemente, Rahman et al. (19) observaron que la estimulación de células endoteliales de vasos umbilicales (HUVEC) con trombina producía aumentos (dependientes del tiempo y de la dosis) de la adhesión endotelial dependiente de ICAM-1 frente a PMN.

La transfección transitoria de células endoteliales con genes del receptor de luciferasa, promotor de ICAM-1, indicó que la mutación/delección una región distante de NF- κ B (-223 bases desde la zona de comienzo de la traslación) impedía la activación del promotor de ICAM-1, lo que indicaba que la zona distante del sitio NF- κ B es crítica para la inducción de trombina. Estos datos indican que además de su papel en la coagulación intravascular, la trombina sirve como mediador fundamental del proceso inflamatorio, por medio de su capacidad para aumentar la activación de NF- κ B y la expresión de ICAM-1 y la adherencia endotelial dependiente de ICAM-1 frente a PMN. Además, estos resultados constituyen una unión importante entre la cascada de coagulación y la respuesta inflamatoria. Debemos recordar que el factor tisular, una proteína fundamental para la coagulación, también está bajo la regulación de NF- κ B. Por último, la trombina probablemente contribuye a la proliferación de la pared vascular que se produce en la aterosclerosis y reestenosis. La trombina estimula la proliferación de VSMC por medio de la activación de NF- κ B (19, 20).

El factor de crecimiento del endotelio vascular parece desempeñar un papel importante en el proceso de la angiogénesis y en las complicaciones vasculares de muchas enfermedades, como la diabetes. Recientemente, Marumo et al. (21) sugirieron la idea de que VEGF podría regular la expresión de MCP-1, una quimiocina que parece reclutar leucocitos en zonas de inflamación, neovascularización y lesión vascular. En células endoteliales de los microvasos de la retina bovina cultivadas, VEGF produjo la expresión de MCP-1, que fue secretada en el medio de cultivo de forma dependiente de la concentración y del tiempo. VEGF también estimuló la capacidad de unión de NF- κ B. Los inhibidores de NF- κ B, N- α -tosil-L-lisina-clorometilquetona (TLCK) atenuaron aquellos efectos. La actividad de unión del factor de transcripción AP-1, que también parece regular la inducción del gen MCP-1, fue también estimulada por VEGF.

Este informe, junto con los resultados de que los productos finales de la glicación avanzados (AGE) y la concentración elevada de glucosa pueden activar a NF- κ B (22), indican que este factor de transcripción desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la angiopatía microvascular diabética. En contraposición con esos datos, en células progenitoras hemopoyéticas, VEGF parece inhibir la activación de NF- κ B, lo que indica que la activación de este factor de transcripción está regulada de forma distinta en células endoteliales vasculares y en células hemopoyéticas. Recientemente se ha sugerido que los monocitos desempeñan un papel importante en la angiogénesis (23). Los monocitos se acumulan en zonas donde tiene lugar la angiogénesis, y el grado de angiogénesis se correlaciona con la acumulación de monocitos. Además, la perfusión local de MCP-1 en la arteria femoral ocluida aumenta considerablemente la angiogénesis posterior (24). Estos resultados indican que algunos de los efectos de VEGF sobre los vasos se deben a la activación de NF- κ B y a las vías AP-1.

Los proteoglicanos (PG) o glicosaminoglicanos (GAG) presentes en las superficies celulares y en el medio extracelular permiten a las células responder a varias moléculas de señal. Entre los GAG, el que se ha estudiado más extensamente es el heparansulfato. El heparansulfato puede actuar aumentando la actividad de la familia de los factores de crecimiento, o modificando la acción de algunas enzimas, como antitrombina III y metaloproteasas de matriz. En datos recientes se ha demostrado que a diferencia del heparansulfato, el dermatansulfato (DS) activa a las células endoteliales en ausencia de moléculas coestimuladoras, como citoquinas o factores de crecimiento, aumentando ICAM-1, ARNm de ICAM-1 en la superficie celular, y es un potente activador de NF- κ B (25). La presencia de PDTC (inhibidor de NF- κ B) en el medio de cultivo bloqueó ICAM-1 inducido por DS, indicando así que DS incrementa ICAM-1 por medio de NF- κ B.

La inyección de DS, pero no de heparina ni otros sulfatos de condroitina, en ratones aumentó considerablemente las concentraciones circulantes de ICAM soluble. Estos datos demuestran que DS inicia los episodios de señal celular que pueden actuar durante la respuesta vascular a la lesión.

El estrés oxidativo y la producción de especies oxigenadas reactivas intracelulares (ROS) se ha considerado

implicado en la patogenia de varias enfermedades (7). En exceso, las ROS y sus subproductos, que producen daño por oxidación, son citotóxicos para las células. Sin embargo, actualmente se sabe que cantidades moderadas de ROS desempeñan un papel en los procesos de transducción de señales, como el crecimiento celular y modificaciones de las proteínas después de la translación. En datos recientes sobre la etiología y patogenia de la aterosclerosis se ha demostrado que este trastorno puede ser considerado como una enfermedad inflamatoria, relacionada con una alteración de las señales mediadas por oxidación en la vasculatura (7). Además de los PMN y los macrófagos, muchos otros tipos de células, como las células endoteliales, las VSMC y los fibroblastos producen concentraciones relativamente bajas de ROS, en respuesta a señales de activación celular. Las citoquinas y los factores de crecimiento, como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina 1 β , angiotensina II e interferón γ inducen la actividad de la NADPH oxidasa unida a la membrana para producir su peróxidos en las células endoteliales (26, 27). Por tanto las ROS pueden funcionar como moléculas de señal, regulando la expresión de los genes vasculares. Así, los inhibidores de la NADPH oxidasa bloquean la expresión de los genes VCAM-1 e ICAM-1, inducida por citoquinas, en células endoteliales de aorta humana y atenúan la activación mediada por angiotensina II de VCAM-1 y MCP-1 en VSMC. Como consecuencia, la generación de ROS por medio de la actividad NADPH oxidasa en respuesta a estímulos proinflamatorios puede regular la expresión de una variedad de genes sensibles a redox en la vasculatura.

Se ha comprobado que la actividad de muchos factores de transcripción está regulada por cambios de tipo redox (7). Generalmente, se ha demostrado que residuos de cisteína conservados en la regiones de unión del ADN de estas proteínas son los blancos de la regulación redox. Los dos factores de transcripción mejor caracterizados sujetos a regulación redox en la vasculatura son NF- κ B y AP1. Se ha sugerido que hay un paso común en todos los mecanismos de activación, que lleva a la degradación de I κ B y a la traslocación nuclear de NF- κ B que está relacionado con ROS (7, 28). Esta conclusión se alcanzó basándose en la inhibición de la activación de NF- κ B por algunos antioxidantes químicamente distintos, como NAC,

ditiocarbamatos, vitamina E y algunos quelantes metálicos. Se ha comprobado la implicación de ROS como activadores comunes de NF- κ B en muchos estudios, en los que se encontraron concentraciones elevadas de ROS por sustancias como TNF- α , IL-1 β , luz ultravioleta e hidroperóxidos. Las moléculas diana que están sujetas a la regulación redox durante la activación de NF- κ B siguen siendo desconocidas. La mayoría de los resultados indican que el estrés oxidativo induce y los antioxidantes impiden la traslocación citoplásmica nuclear de NF- κ B, probablemente debido a la fosforilación y posterior de degradación de I κ B. Sin embargo, en un reciente estudio de exposición de HUVEC a hipoxia, la reoxigenación después de la hipoxia, o una sustancia intermedia de oxígeno reactivo (H₂O₂), que reveló que la activación de NF- κ B no estaba asociada a I κ B α , paso bioquímico que es necesario para la activación de NF- κ B inducida por TNF α (y por muchos otros estímulos) (29). De hecho, el conocimiento del papel de los procesos redox para controlar la multitud de episodios de señal que regulan la actividad de NF- κ B posiblemente permitirá descubrir nuevos sistemas terapéuticos.

Pruebas *in vivo*

Atherosclerosis. Muchos de los genes que participan en la respuesta inflamatoria aguda, que son fundamentales para el proceso aterogénico, se activan potencialmente por NF- κ B. Se ha demostrado recientemente la presencia de NF- κ B en el núcleo de los macrófagos, VSMC y células endoteliales de las lesiones ateroscleróticas humanas (Figura 3) (15), y el grado de activación de NF- κ B correlacionado con el grado de progresión de la lesión aterosclerótica. Se ha demostrado también una relación entre la sensibilidad al desarrollo de franjas grasas y la activación de NF- κ B vascular y hepático en respuesta a una dieta aterogénica (16). En un modelo acelerado de aterosclerosis inducido en las arterias femorales de conejos mediante disección endotelial y dieta aterogénica, comprobamos un aumento de NF- κ B (en VSMC y macrófagos), y en las subunidades p50 y p65 de NF- κ B, como componentes de esta actividad. También se expresó MCP-1 (el ARM mensajero y la proteína) en los vasos lesionados de forma simultánea a la infiltración de

macrófagos en la neointima. También se observó una activación de NF- κ B en la aorta y en el hígado, es decir en tejidos expuestos sólo a hipercolesterolemia sin lesión local, lo que indica que el papel del colesterol circulante es importante (11). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Liao et al. (16) y constituye una relación entre la hiperlipidemia y la rotura de la placa. Debe destacarse que los inhibidores de ACE quinapril y atorvastatina redujeron la activación de NF- κ B, la expresión de MCP-1 y de los macrófagos en el vaso dañado, lo que indica los efectos clínicos beneficiosos de estos fármacos en las coronariopatías (9-11).

También se ha considerado la posible participación de NF- κ B en las etapas que se producen después de la isquemia y la reperfusión.

Durante la reperfusión miocárdica, la adhesión de PMN, que afecta a ICAM-1 puede originar el agravamiento y prolongación de la lesión por reperfusión. En corazones aislados sometidos a isquemia (15 min), se encontró activación de NF- κ B y expresión de ARN mensajero de ICAM-1 después de 30 minutos de reperfusión y hasta los 240 minutos. La adhesión de PMN dependiente de ICAM-1 también aumentó 2,5 veces en comparación con la adhesión de PMN obtenida durante la reperfusión aguda. La transfección de NF- κ B atrae a los oligonucleótidos en corazones aislados usando sobrerregulación de ICAM-1 bloqueada por HJV-liposomas y adhesión de PMN. Efectos similares se obtuvieron usando un inhibidor de TNF α . Estos datos indican que la isquemia de la reperfusión en corazones aislados puede producir secreción de TNF α , activación de NF- κ B y sin sobrerregulación de ICAM-1 y adhesión de PMN (30).

En un artículo reciente, Ritchie (31) sugirió la hipótesis de que la activación de NF- κ B en células mononucleares circulantes podría ser un marcador de la actividad de las coronariopatías. Este autor estudió consecutivamente a 102 pacientes sin infarto de miocardio agudo que iban a someterse a cateterización cardíaca. En los análisis se demostró que 17 de 19 pacientes con angina inestable tenían una activación considerable de NF- κ B. Por el contrario, a pesar de que había un número significativo de pacientes con coronariopatías graves (69%), sólo 2 de los 83

pacientes sin angina inestable presentaban una activación considerable de NF- κ B. De acuerdo con el autor, la activación de NF- κ B en pacientes con angina inestable persistió durante menos de 24 horas y no se observó en aquellos que se presentaron más de 24 horas después de un infarto de miocardio. Estos datos indican que la activación de NF- κ B es un episodio fundamental y podría, por tanto, considerarse como un marcador de la coronariopatía. Deben realizarse otros estudios para confirmar y ampliar estas observaciones iniciales.

Sin embargo, debe destacarse que el NF- κ B circulante está elevado en enfermedades como diabetes y en pacientes con sepsis (32, 33). Además, nosotros hemos comprobado que NF- κ B se activa en células mononucleares después de un desayuno rico en grasas en sujetos sanos (sin publicar).

EL NF- κ B Y RESPUESTA ARTERIAL A LA LESIÓN POR CATÉTER-BALÓN

La activación de las células endoteliales y la desorganización de las VSMC son episodios clave en el desarrollo de la enfermedad vascular. Además, la lesión de los vasos origina una respuesta inflamatoria que se caracteriza por la elaboración de citoquinas y factores de crecimiento, que, finalmente, influyen en las VSMC, contribuyendo a la aterogénesis.

Se ha demostrado que NF- κ B desempeña un papel en la regulación de la expresión de los genes y en la proliferación de VSMC cultivadas (34). Aunque algunos grupos han sugerido que NF- κ B puede participar en la respuesta arterial a la proliferación de VSMC asociada con la lesión vascular. La lesión por catéter-balón de la arteria carótida de ratas ha sido el modelo experimental más utilizado. Mediante pruebas de cambio de movilidad electroforética (EMSA), se encontraron concentraciones bajas de p50, p65 y cRel activados constitutivamente en arterias carótidas normales, mientras que se observó una inducción de cinco veces en períodos de proliferación rápida de VSMC y formación de neointima tras la denudación con catéter-balón. Se observó la expresión de los genes regulados VCAM-1 y MCP-1 en VSMC cuatro horas después de la lesión y coincidió con la infiltración de macrófagos. Juntos, estos resultados relacionan la activación de NF-

kB con la formación de la lesión de la íntima y con la respuesta inflamatoria asociada con VSMC después de la lesión vascular (35).

REGULACIÓN FARMACOLÓGICA DE NF-kB

Puesto que NF-kB se activa por muchos factores (infecciones víricas, sustancias oxidantes, antígenos, citoquinas y sustancias vasoactivas) que participan en la respuesta inflamatoria y en la lesión vascular en general, no es sorprendente que NF-kB sea un blanco obvio para nuevos tratamientos. Hay muchos datos que demuestran que los efectos inflamatorios de los glucocorticoides se deben en un grado importante a sus acciones sobre los factores de transcripción, como NF-kB y AP-1. Los glucocorticoides inhiben a NF-kB, al menos por medio de dos mecanismos (36, 37). Primero, los receptores de glucocorticoides activados interactúan directamente e inhiben a las subunidades activadas de NF-kB. Los glucocorticoides también aumentan la transcripción del gen IκB, aumentando así la formación de esta proteína, que se une al NF-kB activado en el núcleo. La proteína IκBα probablemente induce la disociación de NF-kB de las zonas kB en los genes diana y hace que NF-kB vuelva al citoplasma. En una glomerulonefritis producida experimentalmente en ratas, la prednisolona impidió la activación de NF-kB en los glomérulos y la posterior expresión del ARN mensajero de moléculas preinflamatorias (38). Los efectos secundarios bien conocidos de los esteroides pueden eliminarse con inhibidores de NF-kB más específicos. Los salicilatos, que son fármacos antiinflamatorios no esteroideos, inhiben la activación de NF-kB en las concentraciones que se usan para tratar a los pacientes con artritis (39).

La ciclosporina (CsA) y la rapamicina, importantes inmunosupresores que actúan sobre los linfocitos T, inhiben la activación de NF-kB inducido en linfocitos T por diferentes estímulos. Debemos destacar que la sobreactivación de NF-kB en células mononucleares circulantes de pacientes con rechazo de un trasplante cardíaco se normalizó por CsA (41).

La rapamicina reduce la formación de neointima en un modelo de lesión por balón en cerdos y revirtió la enfermedad vascular del injerto crónica en un modelo de aloinjerto cardíaco nuevo (42). En este sentido,

rapamicina bloquea la inducción de NF-kB tras la coestimulación por CD28 en linfocitos T (43). FK 506, otro inhibidor de calcineurina, bloquea la activación de c-Rel en linfocitos B y T.

El óxido nítrico (NO) inhibe la adhesión plaquetaria y la proliferación de VSMC y regula la adhesión de leucocitos. Debe destacarse que NO inhibe la activación de NF-kB en células endoteliales humanas cultivadas en respuesta al tratamiento con TNFα por medio de un mecanismo similar al descrito para los glucocorticoides (44, 45). También es importante tener en cuenta que NF-kB regula por transcripción el gen iNOS y, de esta forma, teóricamente la producción de NO puede bloquear su propia producción por medio de la inhibición de NF-kB.

Los fármacos reductores de colesterol retrasan la progresión de la aterosclerosis coronaria y reducen la incidencia de episodios isquémicos. Además, los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa también reducen la mortalidad total y coronaria, en la prevención primaria y secundaria. Debe destacarse que hay resultados recientes que indican que el efecto de las estatinas está más allá de su efecto hipolipémico. En artículos recientes se ha demostrado que lovastatina inhibe la activación de NF-kB inducida por LPS en células mesangiales y que también inhibe la expresión de células mesangiales y la producción de MCP-1, IL-6 (46). Nosotros hemos demostrado recientemente que en un modelo experimental de aterosclerosis, desarrollado en conejos, atorvastatina redujo la actividad de NF-kB en la neointima y en la media, coincidiendo con un descenso de MCP-1, del contenido de macrófagos y del tamaño de la lesión (11) (Figura 3).

En VSMC y células mononucleares cultivadas, atorvastatina inhibe la actividad de NF-kB de forma dependiente de la dosis y la expresión del ARM mensajero de MCP-1 e IP-10, desencadenada por TNFα y angiotensina II. Este efecto fue revertido por el mevalonato y por los isoprenoides farnesilpírofosfato y geranilgeranilpírofosfato (precursores de los productos intermedios isoprenilados). El mecanismo de reducción de la activación de NF-kB por las estatinas parece estar relacionada con la estabilización de la subunidad inhibidora IκB. Las estatinas ayudan a mantener la

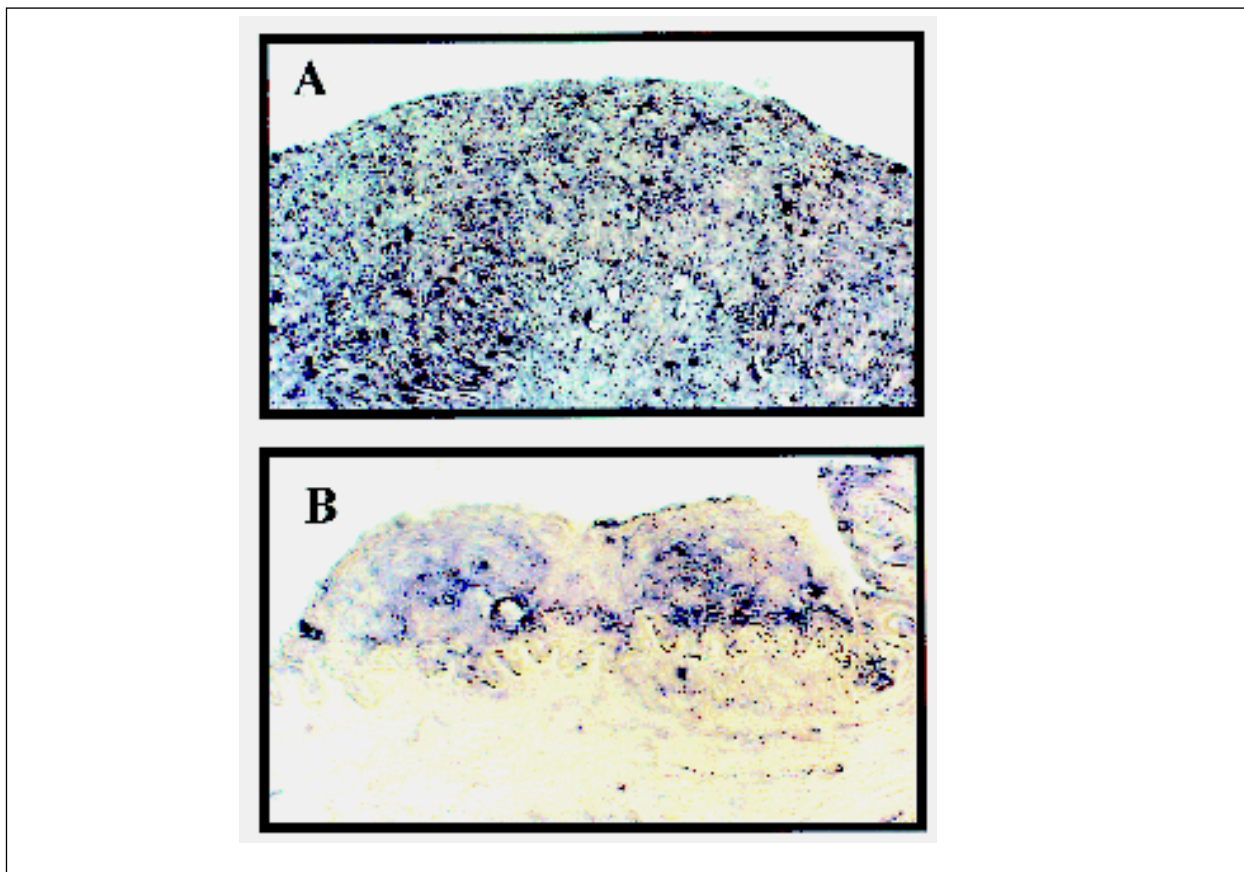


FIG. 3. Activación de NF- κ B in situ. Se determinó la activación de NF- κ B en las arterias femorales de conejos ateroscleróticos mediante la técnica histoquímica de south-wester. Los núcleos positivos aparecen teñidos en negro. (A) Animales de control y (B) animales tratados con estatina.

concentración de proteínas, aumentando la expresión del ARN mensajero de I κ B, o podrían inhibir algunos pasos de la fosforilación, evitando así la degradación de I κ B (47). Además, la reducción de proteínas isopreniladas inducida por las estatinas origina inactivación de las proteínas G y Ras, que es necesaria para múltiples vías de señal intracelular (48).

Los antioxidantes también pueden reducir la activación de NF- κ B. Se ha comprobado que varios antioxidantes, como PDTC, el precursor del glutatión NAC y la enzima antioxidante tioredoxina inhiben a NF- κ B en varios sistemas celulares (7). Por ejemplo, Duque et al. (49) han demostrado que el pretratamiento de células mesangiales humanas con PDTC inhibe la activación de NF- κ B y la expresión de ARN mensajero de MCP-1, IL-8, y proteína 10 inducible por interferón. Algunos estudios epidemiológicos han demostrado que α -tocoferol tiene efectos protectores frente a las enfermedades cardiovasculares. Recientemente, g-

tocoferol, la estructura principal de tocoferol el en la dieta de los Estados Unidos, produjo una disminución de la activación de NF- κ B en células endoteliales de las arterias coronarias humanas cultivadas producida por oxLDL (14). En ratas sometidas a provocación con lipopolisacárido (LPS), se observó una activación de NF- κ B, seguida por la inducción de genes proinflamatorios (TNF α , COX2, CINC e ICAM-1) en el corazón y en el hígado de estos animales (50).

La administración del antioxidante PDTC produjo una inhibición de NF- κ B y la expresión de estos genes proinflamatorios y sus productos, indicando así que el bloqueo de la activación de NF- κ B puede ser una estrategia eficaz para el tratamiento del shock séptico (50). De hecho, PDTC protege a los ratones del shock letal inducido por LPS o TNF α (51).

La mayoría de los tratamientos farmacológicos mencionados anteriormente producen una inactivación parcial de NF- κ B. Además, se han desarrollado algunos

sistemas experimentales para inhibir la actividad de NF- κ B, como los mutantes I κ B α transdominantes, los oligonucleótidos antisentido p65, la microinyección de I κ B α y de inhibidores de proteasas (52). Las estrategias basadas en la manipulación de las concentraciones de I κ B α tienen un interés teórico debido al papel central de esa proteína en la traslocación de NF- κ B. Algunos resultados preliminares indican que la interferencia con la activación de NF- κ B por inhibidores específicos de la degradación de I κ B por los proteasomas puede ejercer efectos favorables en el shock hemorrágico y en el asma (53).

La caracterización bioquímica de la quinasa I κ B puede precipitar la búsqueda de inhibidores específicos. En estudios experimentales recientes se ha tenido éxito en la prevención de la activación de NF- κ B por medio de la transferencia por adenovirus de I κ B (33). Sin embargo, todos estos son intentos no selectivos de bloquear la activación de NF- κ B. Dada la importancia de NF- κ B en la respuesta inmune, dicho procedimiento puede ser peligroso. El mejor conocimiento de los mecanismos de activación específicos de las distintas formas de NF- κ B en diferentes líneas celulares, así como la interacción con otros factores de transcripción, puede aportar medios para conseguir un bloqueo más selectivo.

En este sentido, el efecto mitogénico de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y de TNF α sobre VSMC cultivadas de arterias humanas *in vitro* se inhibió por medio de la introducción liposómica de I κ B α (54) y, por tanto, esto puede representar un método terapéuticamente accesible para seleccionar la supresión por transcripción de genes implicados en la lesión vascular.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos de los autores citados aquí se han financiado mediante becas del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (96/2021, 98/1269, 99/0139, 99/0425), Ministerio de Educación (PM-97/0085, PM-95/0046), Comunidad de Madrid (08/076/86, 083/0002/98, 08.4/0003/1997, 08.4/0007/1999), beca concertada con EU, BMH4-CT98-3631 (DG12-SSMI) e Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Papavassilio AG. Transcription factors. *N Engl J Med* 1995; 332: 45-47.
- Rosenthal N. Regulation of gene expression *N Engl J Med* 1994; 331: 931-933.
- Bauerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.
- Baldwin Jr, AS. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 649-681.
- May NH, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunology Today* 1998; 19: 80-88.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor κ B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066-1071.
- Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in vasculature. *Circ Res* 1999; 85: 753-766.
- Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-784.
- Hernández Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, Ruiz Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor- κ B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997; 95: 1532-1541.
- Hernández Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Egido J. ACE inhibitor quinapril reduces the arterial expression of NF- κ B-dependent proinflammatory factors but not of collagen I in a rabbit model of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1825-1837.
- Bustos C, Hernández Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 2057-2064.
- Hernández Presa MA, Gómez Guerrero C, Egido J. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. Technical note. *Kidney Int* 1999; 55: 209-214.
- Ares MP, Kallin B, Eriksson P, Nilsson J. Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor κ B in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1584-1590.
- Li D, Saldeen T, Mehta JL. γ -tocopherol decreases Ox-LDL-mediated activation of nuclear factor- κ B and apoptosis in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 157-161.
- Kaltschmidt C, Bauerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor NF- κ B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; 97: 1715-1722.
- Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Susus AJ. Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 1993; 91: 2572-2579.
- Brand K, Page S, Walli AK, Neumeier D, Bauerle PA. Role of nuclear factor- κ B in atherogenesis. *Exp Physiol* 1997; 82: 297-304.
- Anrather D, Milan MT, Palmetshofer A, Robson SC, Geczy C, Ritchie AJ, Bach FH, Ewenstein BM. Thrombin activates NF- κ B and potentiates endothelial cell activation by TNF. *J Immunol* 1997; 159: 5620.

19. Rahman A, Anwar KN, Ture AL, Malik AB. Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF- κ B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *J Immunol* 1999; 162: 5466-5476.
20. Nakajima T, Kitajima I, Shin H, Takasaki K, Shigeta K, Abeyama K, Yamashita Y, Tokioka T, Soejima Y, Maruyama I. Involvement of NF- κ B activation in thrombin-induced human vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 950.
21. Marumo T, Schini-Kerth B, Busse R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor- κ B and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes* 1999; 48: 1131-1137.
22. Morigi M, Angioletti S, Imberti B, Donadelli R, Micheletti G, Figliuzzi M, Remuzzi A, Zoja C, Remuzzi G. Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in an NF- κ B-dependent fashion. *J Clin Invest* 1998; 101: 1905-1915.
23. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rapid hindlimb. *J Clin Invest* 1998; 101: 40-50.
24. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemoattractant protein 1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 1997; 80: 829-837.
25. Penc SF, Pomahac B, Eriksson E, Detmar M, Gallo RL. Dermatansulfate activates nuclear factor- κ B and induces endothelial and circulating intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest* 1999; 103: 1329-1335.
26. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-1148.
27. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumor necrosis factor alpha activates a p22 phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998; 329: 653-657.
28. Li N, Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 1999; 13: 1137-1143.
29. Canty TG, Boyle EM, Farr A, Morgan EN, Verrier ED, Pohlman TH. Oxidative stress induces NF- κ B nuclear translocation without degradation of I κ B α . *Circulation* 1999; 100 (suppl II): II-361-II-364.
30. Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P, Kelly RA, Becker BF. Tumor necrosis factor- α contributes to ischemia and reperfusion induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res* 1999; 84: 392-400.
31. Ritchie ME. Nuclear factor- κ B is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. *Circulation* 1998; 98: 1707-1713.
32. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel Kjhalek AK, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B. *Diabetologia* 1999; 42: 222-232.
33. Bohrer H, Qui F, Zimmermann T, Zhang Y, Jilmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP. Role of NF- κ B in the mortality of sepsis. *J Clin Invest* 1997; 100: 972-985.
34. Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE. Expression of a constitutive NF- κ B like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995; 96: 2521-2527.
35. Landry DB, Couper LL, Bryant SR, Lindner V. Activation of the NF- κ B and I κ B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule 1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol* 1997; 151: 1085-1095.
36. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, Matsushima K. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. NF- κ B is a target for glucocorticoid mediated IL-8 gene repression. *J Biol Chem* 1994; 269: 13289-13295.
37. Scheinmann R, Gualberto A, Jewell C, Cidlowski J, Baldwin A. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 943-953.
38. Sakurai H, Shigemori N, Hisada Y, Ishizuka T, Kawashima K, Sugita T. Suppression of NF- κ B and AP-1 activation by glucocorticoids in experimental glomerulonephritis in rats: Molecular mechanisms of anti-nephritic action. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 252-262.
39. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF- κ B by sodium silylate and aspirin. *Science* 1994; 265: 956-959.
40. O'Neill E. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I κ B/MAD-3 an inhibitor of NF- κ B. *EMBO J* 1994; 13: 861-870.
41. Burke SE, Lubbers NL, Chen YW, Hsieh GC, Mollison KW, Luly JR, Wegner CD. Neointimal formation after balloon-induced vascular injury in Yucatan minipigs is reduced by oral rapamycin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33: 829-835.
42. Poston RS, Billingham M, Hoyt EG, Pollard J, Shorthouse R, Morris RE, Robbins RC. Rapamycin reverses chronic graft vascular disease in a novel cardiac allograft model. *Circulation* 1999; 100: 67-74.
43. Lai JH, Tan TH. CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I κ B α which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin. *J Biol Chem* 1994; 269: 370-80.
44. Zeiher A, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circulation Res* 1995; 76: 980-986.
45. Peng HB, Libby P, Liao J. Induction and stabilization of I κ B α by nitric oxide mediates inhibition of NF- κ B. *J Biol Chem* 1995; 270: 214-219.
46. C, Kim Y, Schoonover CM, Massy ZA, O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF, Kashtan CE. Lovastatin inhibits lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation in human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 990-996.
47. Ortego M, Bustos C, Hernández Presa MA, Tuñón J, Díaz C, Hernández G, Egido J. Atorvastatin reduces NF- κ B activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 1999; 147: 253-261.
48. Guizarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Díaz C, Hernández G, Egido J. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 1998; 83: 490-500.
49. Duque N, Gómez-Guerrero C, Egido J. Interaction of IgA with Fc α receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor- κ B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. *J Immunol* 1997; 159: 3474-3482.
50. Liu SF, Ya X, Malik AB. Inhibition of NF- κ B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation* 1999; 100: 1330-1337.

51. Lauzurica P, Martínez-Martínez S, Marazuela M, Gómez del Arco P, Martínez-AC, Sánchez-Madrid F, Redondo JM. Pyrrolidinedithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNF- α . *Eur J Immunol* 1999; 29: 1890-1900.
52. Bequaparlant P, Hiscott J. Biologic and biochemical inhibitors of the NF- κ B/Rel proteins and cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 175-190.
53. Elliott PJ, Pien CS, McCormack TA, Chapman ID, Adams J. Proteasome inhibition: A novel mechanism to combat asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 294-300.
54. Selzman CH, Shames BD, Reznikov LL, Miller SA, Meng X, Barton HA, Werman A, Harken AH, Dinarello CA, Banerjee A. Liposomal delivery of purified inhibitory- κ B α -induced human vascular smooth muscle proliferation. *Circ Res* 1999; 84: 867-875.