



Complicaciones macrovasculares de la diabetes:
Rol de NFAT y proteínas afines como posibles blancos
terapéuticos.

Integrantes del grupo:

Facundo Camacho

Florencia Ferrés

Nataly Carbajal

Pablo Camejo

Paola dos Santos

Rodrigo Sequeira

Orientador: Fabiana Blanco

Departamento de Biofísica. Laboratorio de Fisiología Cardiovascular.

Ciclo de Metodología Científica II-2019.

Grupo N° 78

ÍNDICE de CONTENIDOS

Resumen /Abstract.....	pág. 3
Diabetes Mellitus	pág. 4
Complicaciones macro- y microvasculares de la diabetes	pág. 5
La pared de los vasos sanguíneos	pág. 6
Aterosclerosis	pág. 6
Hiperglicemia y daño celular	pág. 8
Características generales de NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)	pág. 9
Activación de NFAT	pág. 11
Regulación de NFAT	pág. 12
Efectos de la activación de NFAT en la macrovasculatura	pág. 13
Efectos de NFAT sobre el ciclo celular	pág. 17
Proteínas Afines (SiRT1, DBC1, KLF4 y KLF5)	pág. 18
Sirtuina 1 (SiRT1)	pág. 18
DBC1.....	pág. 19
Interacción SiRT1-DBC1 en la hiperglicemia	pág. 21
KLF4 y KLF5	pág. 22
Discusión y Conclusiones	pág. 25
Referencias Bibliográficas	pág. 27

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica, con una alta incidencia mundial. Además de las complicaciones microvasculares que trae consigo la DM y que llevan al desarrollo de retinopatía, nefropatía y neuropatía; se sabe que existe una creciente incidencia de complicaciones macrovasculares que afectan arterias de gran y mediano calibre, favoreciendo el desarrollo de aterosclerosis. A pesar de las numerosas evidencias clínicas y experimentales que relacionan la diabetes con la aterosclerosis, no se conoce con exactitud el mecanismo molecular que vincula la hiperglicemia con la aterosclerosis. NFAT es una familia de factores de transcripción que están presentes y juegan un rol en el sistema cardiovascular. Se sabe que NFAT se activa por hiperglicemia en la pared vascular actuando como un "sensor" de glucosa. Una vez activado genera la expresión de marcadores inflamatorios y moléculas de adhesión en las células de los vasos, promoviendo el desarrollo de aterosclerosis. Este trabajo describe en profundidad la vía de señalización de NFAT, la cual podría estar subyaciendo la enfermedad vascular diabética. También se describen algunas proteínas afines (SiRT1, DBC1, KLF4 y KLF5) que tienen participación en el desarrollo de la aterosclerosis. Finalmente, se especula sobre el posible vínculo entre NFAT y dichas proteínas en la aterosclerosis inducida por diabetes.

Palabras clave: NFAT (Nuclear factor of activated T- cells), hiperglicemia, diabetes mellitus, complicaciones macrovasculares, aterosclerosis.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease, with a high world incidence. In addition to microvascular complications that brings DM and leads to the development of retinopathy, nephropathy and neuropathy; it is known that there is a growing incidence of macrovascular complications that affect large and medium caliber arteries, increasing the development of atherosclerosis. Despite the vast clinic and experimental evidences linking diabetes and atherosclerosis, it is still unclear the molecular mechanisms that link hyperglycemia with atherosclerosis. NFAT is a family of transcription factor which are present and play a role in the cardiovascular system. NFAT is activated by hyperglycemia in the vascular wall acting like a glucose sensor. Once activated, it produces an expression of inflammatory markers and adhesion molecules in vascular cells, leading to the development of atherosclerosis. This work describes in detail the NFAT signaling pathway, which could be underlying the vascular disease induced by diabetes. Also are described some related proteins (SiRT1, DBC1, KLF4 and KLF5) that participate in the development of atherosclerosis. Finally, it is speculated about the possible link between NFAT and these related proteins in the diabetes-induced atherosclerosis.

Keywords: NFAT (Nuclear factor of activated T- cells), hyperglycemia, diabetes mellitus, macrovascular complications, atherosclerosis.

Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica epidémica que tiene una gran incidencia a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2014, 422 millones de adultos presentaban la enfermedad y se estima que aumente a 700 millones para el año 2025(1). En Uruguay, según encuestas realizadas por el Fondo Nacional de Recursos, en Montevideo en el año 2013, el 6% de la población entre 15 y 64 años padecía dicha enfermedad(2).

La DM se caracteriza por un estado de hiperglicemia crónica, asociado en algunos casos a disturbios en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas. El estado hiperglicémico es favorecido por un déficit en la secreción de insulina, hormona encargada de regular los niveles de glucosa en sangre, o un déficit en el efecto de la insulina sobre los tejidos periféricos(3).

Actualmente se utilizan cuatro criterios para el diagnóstico de DM(3):

-Glicemia en ayunas \geq a 126 mg/dl (7,0 mmol/L), considerándose ayuna a un período de 8 horas o más sin ingesta calórica.

-Glicemia \geq a 200 mg/dl (11,1 mmol/L) durante una Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG), a los 120 minutos de haber ingerido una solución con una carga de 75 gr de glucosa diluida en agua.

-Hemoglobina glicosilada (HbA1c) \geq a 6,5% (4,8 mmol/mol).

-Glicemia al azar \geq a 200 mg/dl en una persona con síntomas clásicos de hiperglicemia (como poliuria o polidipsia) o una crisis hiperglicémica.

Los tres primeros criterios mencionados, requieren la confirmación con un segundo análisis anormal con una nueva muestra de sangre, ya sea el mismo test utilizado anteriormente (por ejemplo dos valores de HbA1c anormales) u otro análisis diferente (por ejemplo una PTOG anormal asociada a una HbA1c anormal)(3).

La DM es una enfermedad heterogénea en cuanto a la clínica y su progresión, por los que las líneas de tratamiento son individualizadas en cada paciente(4).

En cuanto a su clasificación, los dos tipos más comunes son la Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) y la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), aunque no siempre es tan clara la división en algunos pacientes, presentando características de ambas. Otros tipos de Diabetes menos frecuentes incluyen la Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), la Diabetes Mellitus Neonatal (monogénica), Diabetes Juvenil de comienzo tardío MODY (también monogénica), diabetes asociadas a enfermedades pancreáticas, asociada a fibrosis quística, diabetes postrasplante y causadas por fármacos. La clasificación de la Diabetes es importante para poder realizar un tratamiento, seguimiento y prever la progresión y las complicaciones que desarrolla dicha enfermedad(4).

La DM1 es causada por déficit en la producción y secreción de insulina, suscitado por la destrucción autoinmune de las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos. Se diagnostica mayormente en niños y adolescentes siendo la cetoacidosis diabética la principal

forma de debut de la enfermedad. En estos pacientes el eje principal del tratamiento es la insulino-terapia(4).

La DM2 se debe a una resistencia a la insulina en los receptores periféricos, que puede asociar posteriormente una carencia en la producción de insulina. Se diagnostica principalmente en pacientes adultos en un contexto de síndrome metabólico, el cual se asocia con un estado de inflamación sistémica y otros factores de riesgo cardiovascular(4). El tratamiento de la DM2 se centra en conservar un buen control metabólico manteniendo la glicemia en un rango de normalidad, asociado a cambios en los hábitos de vida hacia conductas saludables y el control de los factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión y las dislipidemias. Esto incluye realizar actividad física diaria, abandono del hábito tabáquico, control de sobrepeso u obesidad y cambios en la dieta. El control de los valores de glicemia se logra asociando fármacos antidiabéticos orales como la metformina, reservándose como última opción la insulino-terapia. Otras terapias menos difundidas, como es la cirugía metabólica o bariátrica, han sido benéficas en pacientes seleccionados para la reducción del índice de masa corporal (IMC)(4).

Complicaciones macro- y microvasculares de la diabetes

Como se mencionó anteriormente, la DM se caracteriza por la presencia de hiperglicemia, la cual produce alteraciones sobre el árbol vascular, lo que lleva al desarrollo de complicaciones macro- y microvasculares, siendo éstas las principales responsables de la morbimortalidad en pacientes tanto con DM1 como con DM2(5).

En las complicaciones microvasculares ocurren daños en los pequeños vasos que llevan al desarrollo de retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética. La retinopatía diabética es la causa principal de pérdida de visión en personas adultas entre 20-74 años y su prevalencia se relaciona con el nivel de glicemia y la duración de la enfermedad base. La nefropatía diabética es la principal causa de insuficiencia renal. Se define por una proteinuria mayor a 500 mg en 24 horas. A nivel renal se identifican cambios patológicos como el aumento del grosor de la membrana basal glomerular, formación de microaneurismas y nódulos mesangiales, entre otros. La neuropatía diabética hace referencia a los signos y/o síntomas en pacientes diabéticos atribuibles al daño de nervios periféricos en las que se descartan otras causas (ejemplo: déficit de vitamina B12, hipotiroidismo, uremia, etc)(5).

Las complicaciones macrovasculares están ocasionadas por el desarrollo de aterosclerosis. Este proceso está dado por un estrechamiento de la luz del vaso, lo que provoca una disminución del flujo sanguíneo que conduce a una perfusión deficiente, principalmente a nivel cerebral, cardíaco y de miembros inferiores. Esto puede llevar al desencadenamiento de enfermedades cardiovasculares (ECV) o accidentes cerebrovasculares (ACV; stroke isquémico o hemorrágico), que son las principales causas de morbimortalidad en los pacientes diabéticos(5).

La pared de los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos proveen la ruta por la cual circula la sangre en el organismo(6). Las arterias son los vasos que llevan sangre desde el corazón hasta los capilares. Las arterias más pequeñas, llamadas arteriolas regulan la cantidad de sangre que ingresa en los capilares. Las venas, que comienzan con la vénula poscapilar, recogen la sangre de la microvasculatura y la redirigen al corazón. Las paredes de las arterias y las venas están constituidas por tres capas concéntricas, llamadas tunicas. Desde la luz del vaso hacia fuera se ubican la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia(6).

La túnica íntima, es la capa más interna de la pared vascular y consta del endotelio, la lámina basal y matriz extracelular (tejido conjuntivo laxo). El endotelio es una monocapa de células orientadas longitudinalmente en dirección del flujo sanguíneo, que desempeña un papel importante en la homeostasis vascular y en la patogenia de múltiples enfermedades, incluyendo la aterosclerosis. Las células endoteliales son responsables de la liberación de sustancias vasoactivas, como por ejemplo el óxido nítrico (NO) que genera vasodilatación y endotelinas con efecto vasoconstrictor; de producción de anticoagulantes y antitrombóticos como la prostaciclina (PGI₂) o de la liberación de factores protrombóticos cuando hay lesión endotelial (como el factor de von Willebrand), entre otras funciones(7).

Los capilares están constituidos sólo por esta túnica.

En arterias y arteriolas, el subendotelio presenta membrana elástica interna (lámina de material elásticofenestrado)(6).

La túnica media está compuesta principalmente por capas concéntricas de células musculares lisas. Esta túnica está delimitada por la lámina elástica interna y la elástica externa y el grosor de la misma puede variar según la región del árbol arterial(6). La túnica adventicia es la capa de tejido conjuntivo más externa del vaso, constituida principalmente por colágeno, fibras elásticas y terminaciones nerviosas. Su espesor es relativamente delgado en las arterias y grueso en las vénulas y venas, donde es el componente principal de la pared vascular. En los grandes vasos, la adventicia posee la vasa vasorum "vasos de los vasos", que irrigan las paredes vasculares, además de nervios que regulan la contracción del músculo liso(6).

La abundancia de los constituyentes de la pared arterial pueden diferir según los diversos sectores del árbol vascular(6).

Aterosclerosis

La aterosclerosis es una afección vascular inflamatoria crónica, caracterizada por una respuesta compleja de cada una de las células de la pared vascular a estímulos nocivos, la cual culmina con la generación de la placa de ateroma. Las placas de ateromas se establecen a nivel de la túnica íntima de los vasos, están constituidas por un núcleo lipídico y una capa fibrosa que a

medida que se desarrollan y modifican, van protruyendo hacia la luz del vaso, produciendo un estrechamiento del lumen(8).

La hipercolesterolemia, constituye el principal factor de riesgo para la formación de las placas de ateroma. Así mismo, la DM y la hipertensión, entre otros, generan a nivel vascular una disfunción endotelial, caracterizada por una disminución de la biodisponibilidad del NO, de agentes anticoagulantes y antiinflamatorios, generando de esa forma un entorno proinflamatorio en el endotelio vascular, favorable para el desarrollo de la aterosclerosis(9).

La formación y desarrollo de la lesión aterosclerótica es un proceso dinámico y secuencial que se inicia por la disfunción endotelial(9).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) encargadas de transportar colesterol a todos los tejidos periféricos juegan un rol importante en el desarrollo de aterosclerosis ya que atraviesan al espacio subendotelial por un aumento de la permeabilidad del endotelio dañado. La disfunción endotelial se ve caracterizada además por el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$) y peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), que se encargan de la oxidación de las LDL (oxLDL). Una vez que ocurre este proceso, cambios a nivel de las células endoteliales favorecen la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 (del inglés vascular cell adhesion protein 1) e ICAM-1 (del inglés intercellular adhesion molecule 1), que pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas(10). Su expresión atrae monocitos, linfocitos T y otros leucocitos que una vez unidos a las mismas ingresan a la íntima, se diferencian a macrófagos, y se transforman en células espumosas una vez que internalizan a las oxLDL(8).

Las células espumosas liberan citoquinas y factores de crecimiento celular como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), lo que induce proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares (CMLV) desde la túnica media hacia la íntima. Las CMLV generan matriz extracelular y macromoléculas como colágeno, proteoglicanos y elastina(11).

A medida que avanza la lesión, los macrófagos y las CMLV mueren por apoptosis. Esto junto a la degradación de colágeno por las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), forman el núcleo necrótico, el cual debilita la capa fibrosa, constituyéndose una placa vulnerable, que conlleva como última complicación a la trombosis(12).

Las placas estables son aquellas que tienen una capa fibrosa gruesa y un núcleo lipídico pequeño, con mucho colágeno. En cambio, las placas vulnerables son las que presentan un gran núcleo lipídico, con una delgada capa fibrosa y un entorno inflamatorio mayor, siendo éstas más propensas a la ruptura y complicación aguda. Los individuos por lo general no presentan una sola placa, sino que presentan varias placas en diferentes territorios vasculares o en un mismo territorio, y dichas placas están en diferentes estadios evolutivos(12).

Hiperglicemia y daño celular

La glucosa es la principal fuente energética del organismo y el ingreso de la misma a las células está facilitado por transportadores de glucosa (GLUT) presentes en la membrana plasmática(13). A nivel de las células endoteliales y CMLV predominan las isoformas de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT10. Una vez que la glucosa ingresa a la célula, sufre un proceso de oxidación (glucólisis), donde se producen intermediarios que tienen como fin la generación de energía para el organismo en forma de ATP. El organelo necesario para llevar a cabo parte de este proceso es la mitocondria(13).

El exceso de glucosa presente en la DM, genera acumulo de intermediarios de esta ruta metabólica (como por ejemplo glucosa-6-fosfato, gliceraldehído-3-fosfato, diacilglicerol, etc.), los cuales son redirigidos a múltiples vías celulares como la formación de AGEs (del inglés advanced glycation end products), la vía de la proteinquinasa C (PKCs) y la vía del poliol, que tienen como producto final el aumento de los ROS. El estrés oxidativo generado por la hiperglicemia y consecuente daño endotelial acelera el proceso de formación y progresión de la placa de ateroma(13).

El estado de hiperglicemia y el estrés oxidativo aumentan la glicosilación no enzimática de proteínas, conduciendo a la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs). En etapas tempranas de dicho proceso se forman glicolalbúmina y HbA1c, parámetro cuantificable a nivel sérico, que nos habla del control metabólico del paciente y conforma uno de los criterios diagnósticos de la DM(13).

A continuación se describen las principales vías implicadas en la generación del daño celular causado por la hiperglucemia (Figura 1):

Formación de AGEs: la principal fuente intracelular y plasmática de AGEs es la fragmentación del gliceraldehído-3-fosfato (GA-3P) a metilglioxal. Los AGEs se relacionan con la aterosclerosis a través de varios procesos. Aceleran la migración de monocitos al espacio subendotelial y su transformación a macrófagos promoviendo la expresión de moléculas de adhesión endotelial. Estimulan la formación de citoquinas por macrófagos e inhiben el transporte reverso de colesterol. Favorecen la vasoconstricción, promoviendo la formación de endotelina 1 y la disminución de NO, y genera modificaciones en la matriz extracelular, acelerando la progresión de aterosclerosis. Además, favorecen la patología aterotrombótica y promueven el estrés oxidativo al unirse a sus receptores RAGE (del inglés receptor for advanced glycation end products). La unión AGEs-RAGE induce el aumento de ROS mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa. En segunda instancia, ROS activa vías ras-MAPquinasa, lo que conduce a la activación del factor nuclear NF- κ B, encargado de la regulación positiva de múltiples moléculas proinflamatorias como interleuquinas 1, 6 y 8 (IL-1, IL-6, IL-8), factor de

necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) y moléculas de adhesión celular incluidas ICAM-1 y VCAM-1(14)(15)(16).

Vía de PKC: esta vía se activa por la síntesis elevada de diacilglicerol (DAG) a partir de GA-3-P y aumento de Ca^{2+} intracelular, ambos mecanismos perpetuados por la hiperglicemia, que serán explicados más adelante. La activación de la PKCs, causa ciertas anormalidades a nivel celular que propician la aterosclerosis. Éstas incluyen incremento de la permeabilidad vascular, aumento del estrés oxidativo (ROS), disfunción endotelial, disminución de la vasodilatación arterial, modificaciones en la expresión de factores de transcripción, incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias e incremento en la producción de matriz extracelular(13).

Vía del poliol: existen evidencias de que la vía del poliol acelera la formación de AGEs mediante el aumento de la producción de fructosa y sus metabolitos, incrementa la producción de ROS al disminuir la producción de glutatión reducido debido al agotamiento de NAD(P)H y activa la vía de PKC gracias al aumento de glicerol-3-fosfato, contribuyendo todo esto al proceso aterosclerótico(13)(17).

Producción de ROS: dichas moléculas se producen por la activación de vías como la unión AGEs-RAGE, vía de PKCs, vía del poliol y la autooxidación de glucosa.

ROS son moléculas altamente reactivas, que interactúan con diversos componentes celulares como proteínas, grasas y ácidos nucleicos, dañando así elementos importantes como el ADN y enzimas, entre ellas la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) que es desacoplada e impide la formación de NO por el endotelio vascular(13). Además, como ya fue mencionado, ROS a través de la activación de NF- κ B mediada por ras-MAPquinasa, participa en la producción de una gran variedad de moléculas proinflamatorias(16).

Características generales de NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)

NFAT es una familia de factores de transcripción caracterizados inicialmente en las células T del sistema inmune, como inductor de la expresión génica de citoquinas. Hoy día, se sabe que NFAT está presente en múltiples tipos celulares que incluyen células endoteliales, CMLV, músculo esquelético, cardiomiocitos, neuronas y células del sistema inmune, entre otros. A nivel celular, NFAT participa en la regulación de la transcripción de múltiples genes cumpliendo funciones específicas(18).

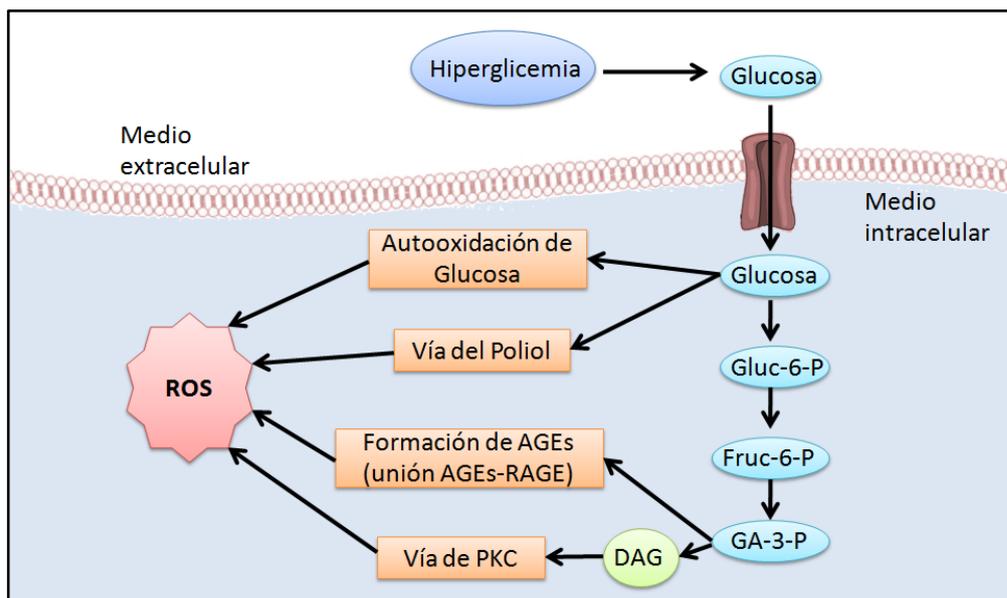


Figura 1. Estrés oxidativo en hiperglicemia. Esquema de las principales vías inducidas por la hiperglicemia, que culminan con la producción de ROS. Estas vías son la autooxidación de glucosa, la vía del poliol, la formación de AGEs con posterior unión a receptores RAGE y la vía de la PKC. Modificado de (13).

Se conocen cinco miembros de esta familia, de las cuales cuatro de ellas, NFATc1, NFATc2, NFATc3 y NFATc4 se localizan en el citosol de las células en reposo y su activación depende de calcio/calcineurina (Ca^{2+}/CaN), mientras que NFAT5 está localizada constitutivamente en el núcleo y no es sensible a la calcineurina(18).

Estructuralmente, las proteínas NFATc1-c4 tienen cuatro dominios, una región homóloga para NFAT (NHR), un dominio homólogo Rel (RHD) y dos dominios de transactivación (TAD) (Figura 2). El dominio NHR cumple funciones regulatorias y es donde se encuentra el sitio de unión a la CaN y cuenta con varios sitios de fosforilación. El dominio RHD media la unión al ADN y los dominios TAD hacen posible la interacción de NFAT con proteínas de la maquinaria de transcripción. Los dominios TAD se encuentran uno en el extremo N-terminal y otro en el C-terminal, siendo esta última región estructuralmente más variable. La isoforma NFAT5 comparte parcialmente la estructura con los otros miembros de la familia, debido a que su mecanismo de activación no depende de Ca^{2+}/CaN y se activa por cambios de osmolaridad, ya que está involucrada en la regulación de genes osmoprotectores(19).

Como mencionamos, NFAT no está limitado a las células del sistema inmune, sino que juega un rol primordial en otros sistemas, incluyendo el sistema cardiovascular. Las isoformas de NFAT participan del desarrollo de las válvulas cardíacas y de la formación del septum, también participan del desarrollo y organización anatómica de los vasos, de la diferenciación celular, diferenciación de músculo esquelético, así como también en la patogenia de algunas entidades, como por ejemplo en la hipertrofia del músculo cardíaco(19).

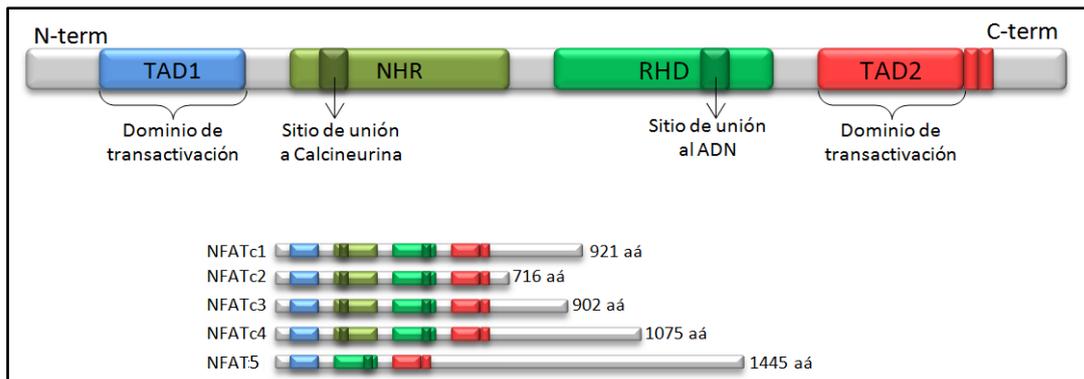


Figura 2. Estructura proteica de NFATc1-c4. Esquema de la estructura de las proteínas NFATc1-c4 con sus principales dominios (NHR, RHD, TADs) y sitios de acción (sitio de unión a CaN y sitio de unión al ADN). En la parte inferior se esquematizan NFATc1-5 de acuerdo a su tamaño en función del número de aminoácidos (aa) que las componen. Modificado de (19).

Se ha visto que las isoformas involucradas en el músculo cardíaco son fundamentalmente NFATc1 y NFATc4, mientras que en el músculo liso predomina NFATc3(19) y en células endoteliales NFATc1 y NFATc3, si bien también se expresan las otras isoformas(20).

Activación de NFAT

En células en reposo, NFAT se encuentra altamente fosforilado e inactivo en el citosol de las células(19). El aumento de Ca^{2+} intracelular, inducido por múltiples estímulos como la hiperglicemia, la hipoxia, diferentes vasoagonistas, etc, es necesario para activar la calmodulina y a su vez este complejo Ca^{2+} /calmodulina activa a la CaN. La hiperglicemia induce la liberación de nucleótidos extracelulares como el UTP y UDP(21), los cuales actúan sobre los receptores P2Y acoplados a proteínas G(22). Esto lleva a la activación de fosfolipasa C, que hidroliza un componente de membrana fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, lo que conduce a la formación de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y DAG. IP3 activa el receptor IP3R, ubicado en el retículo sarcoplásmico (SR), induciendo así la liberación de Ca^{2+} de dicho organelo, aumentando la concentración intracelular de Ca^{2+} (23).

Además, otro determinante del aumento del Ca^{2+} inducido por hiperglicemia, es DAG que activa la vía de PKC con el consiguiente aumento de ROS.

Se sabe que la mitocondria es una fuente generadora de ROS en contextos de hiperglicemia e hiperlipemia. Si bien aún no está del todo claro, en la actualidad hay una fuerte tendencia a investigar el papel de ROS generado por la mitocondria sobre el aumento del Ca^{2+} intracelular en dichos contextos, y cómo esta vía es capaz de activar NFAT(24).

Posteriormente al aumento de Ca^{2+} intracelular, éste se acopla a la calmodulina y activa la enzima fosfatasa CaN por medio de su unión a la subunidad catalítica (CnA) de ésta, mientras que la subunidad reguladora (CnB) defosforila los múltiples residuos de serina de NFAT, por un acoplamiento en la porción N-terminal, generando un cambio conformacional en la proteína

NFAT, permitiendo su unión a importinas que facilitan su translocación al núcleo y unión al ADN. De esa manera NFAT regula la transcripción de distintos genes, como por ejemplo los de las citoquinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TNF- α , GM-CSF, INF- γ , y los de los receptores de superficie Fas-L y CD-40L en células T(25).

A nivel del músculo liso vascular, el aumento del Ca²⁺ intracelular depende del agotamiento de las reservas de Ca²⁺ desde el SR así como del influjo de Ca²⁺ extracelular por canales de Ca²⁺ tipo L voltaje dependientes (VDCC), lo que mantiene las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ de manera sostenida, necesario para la activación de NFAT(25). A nivel del SR existen dos tipos de canales responsables de la liberación de Ca²⁺, el IP3R responsable del incremento inicial de Ca²⁺ intracelular que ocurre en respuesta a la fosforilación de fosfolipasa-C acoplada a proteína G, y los receptores de rianodina (RyR)(19).

Regulación de NFAT

Como en todos los procesos celulares existe un balance entre mecanismos activadores, e inhibidores.

Como se mencionó anteriormente, el estado inactivo de este factor de transcripción se debe a su fosforilación, la cual ocurre a nivel del núcleo, y es llevado a cabo por distintas quinasas nucleares. Una vez fosforilado, es exportado del núcleo al citosol donde nuevamente ocurre su activación, fluctuando entonces entre su estado activo o defosforilado y su estado inactivo o fosforilado. Se ha visto que existen tanto quinasas constitutivas como inducibles y esto de alguna manera permitiría teóricamente una modulación continua de la vía de señalización de NFAT. Quinasas de expresión constitutiva que promueven la exportación nuclear de NFAT son por ejemplo GSK-3 (Glycogensynthasekinase 3) y CK-1 (Caseinkinase 1), mientras que MAPquinasas p38 y JNK (N-terminal c-Jun) son quinasas de expresión inducible(4).

Se ha estudiado la relación entre los niveles séricos de glucosa y la activación de la isoforma NFATc3 en arterias aorta y cerebrales de ratones. En dicho trabajo se demostró que la hiperglicemia (glucosa extracelular entre 11,1 y 15 mmol/L) promueve no solo la translocación de NFAT al núcleo, sino también su retención en el mismo, al dificultar su exportación hacia el citosol. Esto se debió a que la hiperglicemia también inhibe a las quinasas nucleares JNK y GSK-3 favoreciendo así la acumulación nuclear de NFAT y su activación. La importancia de que la glucosa active NFAT mediante los receptores P2Y y que inhiba ciertas quinasas, hace que NFAT se mantenga activo en el núcleo y así promueva la expresión génica de citoquinas(20)(21)(26).

Efectos de la activación de NFAT en la macrovasculatura

Se ha demostrado en diferentes trabajos que la hiperglicemia activa NFAT en los vasos arteriales.

En un estudio realizado en ratones diabéticos competentes y deficientes para la isoforma NFATc3, se observó que en los ratones competentes había una acumulación nuclear de NFATc3 y un aumento de la actividad de NFAT en las arterias cerebrales y aórticas en respuesta a la hiperglicemia(21).

En un estudio realizado en el año 2013 por un grupo de investigadores de la Universidad de Lund, se estudió el rol de NFAT en el desarrollo de aterosclerosis en la arteria aorta en un modelo *in vivo* de ratones diabéticos ApoE^{-/-}(27). ApoE es una proteína estructural de casi todas las lipoproteínas (excepto las LDL) y su ausencia causa hiperlipidemia al impedir la metabolización hepática de triglicéridos y colesterol. Recordar que la hiperlipidemia es uno de los factores causante de aterosclerosis. En dicho estudio se conformaron cuatro grupos de ratones ApoE^{-/-}. Dos grupos recibieron estreptozocina (STZ) durante 5 días consecutivos a dosis de 60mg/kg intraperitoneal (i/p) y los otros dos grupos recibieron buffer citrato (solvente de la STZ; i/p). La STZ es un antibiótico que produce destrucción de las células β pancreáticas y por tanto disminuye la producción de insulina, generando un modelo de DM1. Luego de 4 semanas de haber comenzado el protocolo experimental, a dos grupos de ratones ApoE^{-/-} (un grupo diabético y un grupo control) se les administró un bloqueador de NFAT (A-285222) a dosis de 0,29mg/kg i/p, durante 4 semanas más; mientras que a los otros dos grupos de ratones se les administró solución salina, como control (Figura 3A)(27). El bloqueador A-285222 es un inhibidor de la actividad de todas las isoformas de NFAT ya que las mantiene en su estado fosforilado en el citosol, impidiendo su exportación nuclear y a diferencia del tradicional inmunosupresor ciclosporina A (CsA), el A-285222 no afecta la actividad fosfatasa de la CaN(28). Semanalmente se controló en los animales el peso corporal y la glucosa en sangre a lo largo de todo el protocolo experimental, durante el cual los ratones recibieron una dieta normal. Si bien no se apreciaron variaciones significativas en el peso corporal (Figura 3B), se observó como era de esperar, un aumento de la glicemia en los ratones tratados con STZ en comparación con el control (Figura 3B). Por otra parte, observaron un incremento estadísticamente significativo del área de la placa de ateroma en la aorta inducido por diabetes, en la semana 8 del protocolo experimental (11,6%. área en ratones ApoE^{-/-} controles vs. 25,4% en ratones ApoE^{-/-} diabéticos) (Figura 4A)(27).

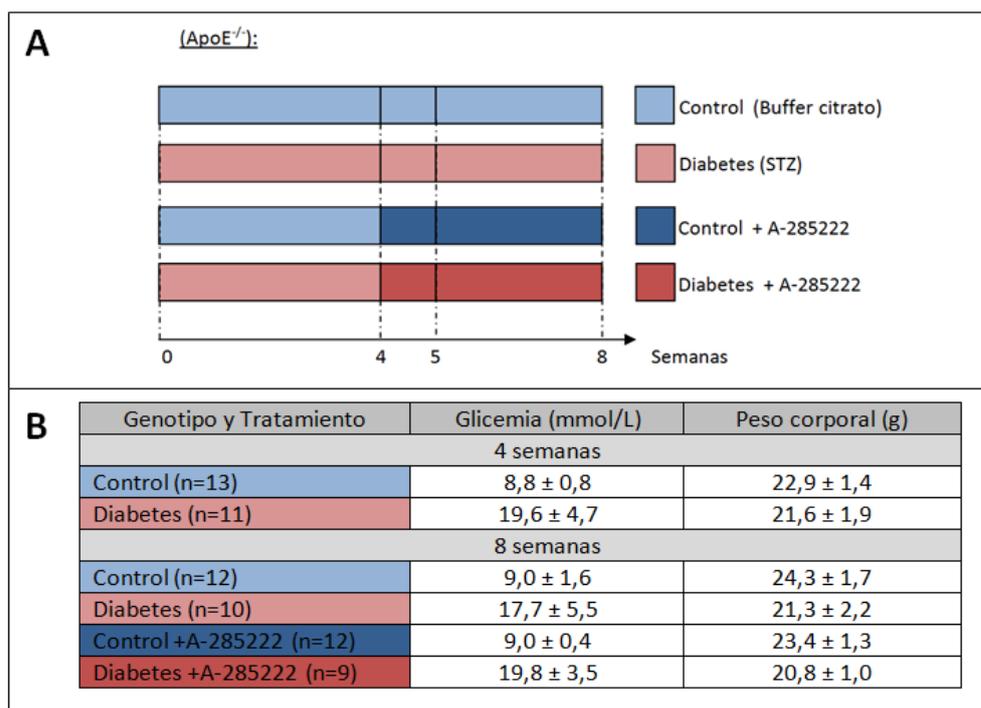


Figura 3. Protocolo experimental. A: Esquema del protocolo experimental donde se visualizan los cuatro grupos de ratones ApoE^{-/-}. Dos grupos tratados con STZ (diabéticos) y dos grupos control. Luego de 4 semanas, a dos grupos (uno diabético y uno control) se les administró bloqueador de NFAT (A-285222, 0,29mg/kg i/p). B: Valores de glicemia y peso corporal de los grupos de ratones obtenidos en el protocolo experimental a las semanas 4 y 8 de iniciado el estudio, expresados como la media±DE. Modificado de(27).

El tratamiento *in vivo* durante cuatro semanas con el bloqueador de NFAT anuló completamente el efecto de la diabetes sobre la placa aterosclerótica, obteniéndose una menor área de lesión. El bloqueador no tuvo efecto en ratones no diabéticos (Figura 4A y 4B).

El área de lesión ateromatosa en la aorta, también fue determinado en la semana 4 y se comparó con las áreas obtenidas en la semana 8 del protocolo. Como muestra la figura 4C, el sólo paso del tiempo (4 semanas) o la edad de los ratones ApoE^{-/-} genera un leve aumento del área ateromatosa en arteria aorta. Además se observó, que la hiperglicemia y por tanto la activación de NFAT, generó una aceleración en la formación de las placas de ateroma, hecho que fue totalmente revertido al usar el bloqueador de NFAT (Figura 4C). Estos resultados evidencian el rol de NFAT en la progresión acelerada de la lesión aterosclerótica en presencia de diabetes.

Interesantemente, los autores del trabajo encontraron que la respuesta al bloque de NFAT no fue la misma para todos los segmentos de aorta estudiados (arco aórtico y aorta torácica descendente), ya que se evidenció un menor efecto del bloqueador de NFAT en la aorta descendente respecto al arco aórtico(27).

Por otro lado, se observó que la formación de la placa de ateroma, fue precedida por el aumento de monocitos en sangre, de la actividad endotelial y de la expresión de marcadores inflamatorios

en la pared vascular. En aorta evidenciaron un aumento de la expresión de las moléculas VCAM-1, MCP-1, IL-1 β y Cox2 a las 4 semanas de inducida la diabetes con STZ, mientras que

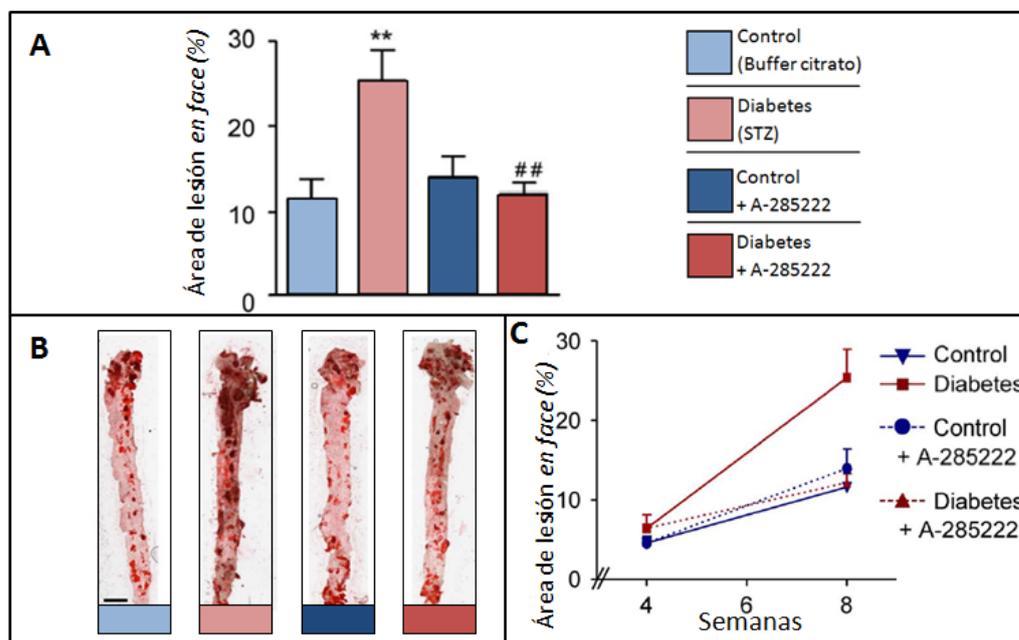


Figura 4. Área de lesión ateromatosa en arterias aortas. **A:** Porcentaje del área de lesión en la aorta de los ratones en los cuatro grupos, a las 8 semanas de haber sido tratados con STZ. El ANOVA para el efecto de la diabetes y el medicamento reveló una interacción significativa entre los factores (** P <0.005). La prueba posterior de Bonferroni arrojó ** P <0.01 vs. ratones control no diabéticos y ## P <0.01 vs. ratones diabéticos tratados con solución salina.

B: Preparaciones representativas *en face* de aorta de ratones tratados como en la figura 4 A, teñidos con tinción ORO (Oil Red O), una tinción específica para lípidos. **C:** Área de lesión ateromatosa en las arterias aortas en función del tiempo, para los cuatro grupos de ratones. Modificado de (27).

se vio un aumento plasmático de los niveles de las citoquinas y marcadores proinflamatorias IL-6, IFN- γ , IL-12, IL-1 β , TNF- α , osteopontina (OPN) y sVCAM después de la semana 8. El bloqueo de NFAT con A-285222 durante 4 semanas, redujo significativamente los niveles séricos de IL-6, pero no se observaron cambios significativos en los niveles plasmáticos de las demás citoquinas(27).

La inhibición de NFAT durante 4 semanas, generó una reducción de la expresión de IL-6, OPN, MCP-1, ICAM-1, CD68 y TF en la pared de la aorta, sin alterar otros parámetros como el peso corporal, glicemia y perfil lípido. En dicho estudio los autores concluyeron que la inhibición de NFAT actúa a nivel local en la placa de ateroma de la arteria aorta y no provoca inmunosupresión sistémica debido a que no se constataron diferencias en la actividad de NFAT en el bazo y timo, ni diferencias en la tasa de proliferación de células T, ni en la producción de citoquinas(27).

La IL-6 es una citoquina importante en el proceso de inflamación, ya que promueve la disfunción endotelial, la proliferación y migración de CMLV y la activación de células

inflamatorias, todos procesos que participan en la progresión de la aterosclerosis. Por su parte, la OPN es una citoquina clave en las enfermedades inflamatorias crónicas, ya que tiene rol fundamental en la progresión de dicha patología. Sus niveles en plasma se relacionan con afectación de la macrovasculatura, como extensión de lesiones coronarias, recidiva de estenosis coronarias luego de tratamientos con angioplastia, y las aneurismas de aorta abdominales(29). El promotor del gen que codifica para OPN cuenta con 4 sitios de unión a NFAT. Un estudio realizado con CMLV extraídas de secciones de aorta de ratones, expuestas a altas concentraciones de glucosa, evidenciaron que en un contexto de hiperglicemia, hubo un aumento de la unión de NFAT a la región 3 del promotor del gen de OPN, evento que se vio inhibido con la presencia del bloqueador de NFAT, A-285222(29).

Otro trabajo realizado por los mismos investigadores de la Universidad de Lund en el año 2018(30), estudió el efecto de la inhibición de NFAT sobre la placa ateromatosa en un novedoso modelo de ratones IGF-II/LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}, los cuales mimetizan las características de la DM2 en humanos. Estos ratones surgieron de la cruce entre ratones deficientes para el receptor LDL (LDLR^{-/-}) y que sólo expresan la apolipoproteína B100 (ApoB^{100/100}), con ratones que sobreexpresan el factor de crecimiento II tipo insulina (IGF-II) en las células β del páncreas(31). El IGF-II es un factor de crecimiento similar a la insulina cuya disminución provoca hiperglicemia. Por otra parte, la función de los receptores de LDL es captar las LDL en sangre a nivel hepático y así disminuir el colesterol en plasma. La ApoB100 es una apolipoproteína presente en los quilomicrones, en las lipoproteínas de baja e intermedia densidad (VLDL e LDL, respectivamente) y en las LDL, responsable de llevar lípidos (incluido el colesterol) a las células a través de su unión a los receptores de LDL presentes en la superficie celular. En consecuencia, la ausencia de los receptores de LDL y la expresión de ApoB100 generan un contexto hipercolesterolémico propenso al desarrollo de aterosclerosis(31).

Los ratones IGF-II/LDLR^{-/-}ApoB^{100/100} se caracterizaron por tener hiperglicemia, una leve hiperinsulinemia, un perfil lipídico similar a los humanos y presentaron lesiones ateroscleróticas complejas y avanzadas. Dicho modelo animal es el que mejor replica la DM2 en personas y es apropiado para estudiar las complicaciones macrovasculares desarrolladas por esta enfermedad(31). Ratones machos y hembras IGF-II/LDLR^{-/-}ApoB^{100/100} fueron alimentados con una dieta rica en grasas durante 8 semanas. Luego de 4 semanas de iniciada la dieta, los animales fueron tratados con el bloqueador de NFAT (A-285222, 0.29 mg/Kg i/p) o con solución salina como control, durante 4 semanas más(30).

Al final del protocolo experimental (8 semanas), observaron que la inhibición de NFAT redujo significativamente el área de placa de ateroma y el grado de estenosis en la arteria braquiocefálica de los ratones machos. Además, constataron que la inhibición *in vivo* de NFAT durante 4 semanas llevó a una regresión de la placa en dicha arteria, sin haberse constatado

cambios en la composición (contenido de macrófagos, colágeno y elastina) de las placas de ateroma(30).

Por otro lado, encontraron que el bloqueo de NFAT durante 4 semanas, generaba cambios en la expresión de marcadores de inflamación y de estrés oxidativo en la pared arterial de los ratones IGF-II/LDLR^{-/-}ApoB^{100/100}. Observaron una disminución significativa de la expresión de CD68 y una tendencia a disminuir IL-6 y OPN en la arteria aorta las hembras. Así mismo, hubo un incremento significativo de la expresión de NADPH oxidasa 4 (NOX4) en la pared arterial de los machos(30). Las NADPH oxidasas (NOXs) son una familia de proteínas presentes en las células de la pared arterial que juegan un rol clave en la generación de ROS. Si bien la mayoría de las isoformas de NOX en contexto diabético inducen y promueven la aterosclerosis, se ha descrito recientemente que la NOX4 tiene un rol ateroprotector tanto en humanos como en ratones(32).

Efectos de NFAT sobre el ciclo celular

El ciclo celular es el mecanismo por el cual las células se multiplican y se obtienen dos células hijas idénticas a la madre. Este proceso está comprendido por dos grandes fases: la interfase (integrada por G0, G1, S y G2) y la mitosis (M). En la fase G0 la células están en estado quiescente, mientras que en G1 se produce el crecimiento de la célula, seguido de la fase S, donde se replica el ADN. En la fase G2 se da la reparación de posibles errores durante la replicación del ADN y comienza el montaje de estructuras necesarias para la división celular. La M es donde la célula se divide en dos células hijas. Este ciclo asegura que las dos células nuevas contengan la misma información genética lo cual se logra por complejos procesos citoplasmáticos y nucleares. El ciclo celular está regulado por “puntos de control”, donde el ciclo puede continuar o detenerse. Las proteínas encargadas de la regulación de estos procesos son las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclina (CDKs)(33). Las ciclinas y CDKs forman complejos donde se activan mediante fosforilación(34).

Las isoformas de NFAT tienen un efecto diferencial en la regulación del ciclo celular. En ratones NFATc2^{-/-}, se observó que el tejido linfoide (células de ganglios linfáticos y bazo) sufría una hiperproliferación, reduciendo la muerte celular. Los linfocitos NFATc2^{-/-} mostraron un periodo de división celular más corto, relacionado a la elevación de la expresión de las ciclinas A2, B1, E y F(34).

Tanto NFATc2 como NFATc1 tiene efecto sobre la ciclina A, NFATc1 inhibe y NFATc2 estimula la expresión de la misma. NFATc1 también activa las ciclinas D1 y D3(34).

En la fase S del ciclo celular, la ciclina A2 actúa junto a CDK2. NFATc2 actúa a este nivel generando una disminución en la expresión de la ciclina A2, mediante la supresión de su promotor. Se ha visto en queratinocitos primarios de ratones, que NFATc2 induce la vía de p21,

que es un inhibidor del complejo ciclina A2/CDK2, haciendo que se detenga el ciclo celular(34).

El complejo formado por ciclinas D1-D3/CDK4-6 actúa en la fase G1 del ciclo. NFATc2 específicamente inhibe competitivamente el promotor de CDK4, mientras que a nivel de las ciclinas D1 y D3 tiene regulación positiva(34).

Si bien hemos comentado anteriormente que NFATc2 actúa principalmente inhibiendo el ciclo celular, hay trabajos que demuestran que en un contexto tumoral, asume un papel como regulador positivo(34).

Se ha investigado además la participación de NFAT en la apoptosis. Estos procesos son complejos y no solo dependen de la isoforma de NFAT, sino también del tipo celular y la vía de señalización que se estudie. En modelos de ratones NFATc1^{-/-} así como NFATc4^{-/-}, se observó un aumento de la proliferación celular del tejido linfoide secundario, lo cual sugiere que estas isoformas de NFAT promueven la apoptosis sobre este tejido. Sin embargo, en modelos de ratones NFATc2^{-/-} se evidenció un aumento de la apoptosis de linfocitos B, concluyendo así que NFATc2 cumple un rol antiapoptótico sobre estas células(34).

En cultivos de fibroblastos de embriones de ratones (NIH 3T3) inoculadas con retrovirus mutantes para NFATc2 y NFATc1 (CA-NFAT), se observó que la inoculación con CA-NFATc2 y CA-NFATc1 generaba efectos opuestos. Mientras que NFATc1 actuó como un regulador positivo de la proliferación celular y un represor de la muerte celular, NFATc2 indujo la detención del ciclo celular y un aumento significativo de la muerte celular(35).

Para conocer el rol de NFAT en la remodelación de la pared vascular, se estudió la expresión génica de las ciclinas A, CDK2 e histonas 1 (proteína que forma parte de la cromatina) en cultivos de CMLV en respuesta al factor de crecimiento PDGF-BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas, inductor de la progresión del ciclo celular) en ausencia y presencia de inhibidores de NFAT como CsA y VIVIT(36). Este último inhibe la interacción de NFAT con la CaN, mediante interacción directa con NFAT, mientras que la CsA inhibe la actividad fosfatasa de la CaN(36). Los resultados evidenciaron que NFAT está involucrado en el ciclo celular y al ser bloqueado impide la progresión de fase G1 a S, afectando la síntesis proteica celular(36).

Proteínas Afines (SiRT1, DBC1, KLF4 y KLF5)

Sirtuina 1 (SiRT1)

Las sirtuinas son enzimas desacetilasas de histona dependientes de NAD⁺ con actividad antioxidante en células endoteliales. En mamíferos, se han descrito 7 isoformas (SiRT 1-7) que actúan en múltiples tejidos (hepático, cardíaco, vascular, muscular, entre otros) regulando el metabolismo celular(37). SiRT1, SiRT6 y SiRT7 tienen localización nuclear, donde actúan al

desacetilar histonas, alterando la expresión génica. Además, SiRT1 modula la acción de algunos factores de transcripción, así como la actividad de algunas enzimas a través de procesos de desacetilación. SiRT2 también se encuentra en el núcleo, pero actúa principalmente en el control del ciclo celular. SiRT3, SiRT4 y SiRT5 son mitocondriales y regulan la actividad de enzimas metabólicas y de enzimas que participan en el estrés oxidativo(37).

A nivel endotelial y principalmente en la patología aterosclerótica tiene fundamental importancia la isoforma SiRT1, donde tiene un rol protector, en contraposición a DBC1, una proteína capaz de inhibir a SiRT1 mediante una interacción directa(38).

Distintas moléculas y estímulos activan a SiRT1, entre ellas el resveratrol, un polifenol natural presente en numerosas plantas y frutos. Se vio que el mismo protege a las células endoteliales del proceso de aterosclerosis mediante el aumento en las enzimas SiRT1, mejora el flujo autofágico y favorece la degradación de oxLDL por la vía de autofagia-lisosoma(39).

Además, se ha visto que el flujo sanguíneo mediante el cizallamiento, también activa la vía de SiRT1. Se ha demostrado en cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana, que el flujo laminar aumenta los niveles de SiRT1 en dichas células. SiRT1 estimula la producción de NO en el endotelio, mediante el aumento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa, enzima que convierte NADH en NAD⁺ permitiendo la acción de SiRT a nivel de eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial)(40).

En un estudio realizado en ratones Apo E^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasas, a los que se les colocó un collar carotideo y se los trató con un inhibidor selectivo de SiRT1 durante 4 semanas, se comprobó que estos ratones tratados desarrollaban mayor área de lesión ateroscleróticas y un aumento de células espumosas en la placa de ateroma, respecto a los ratones control(40)(41)(42).

En un trabajo reciente donde se estudió si SiRT1 era capaz de suprimir la actividad transcripcional de NFAT, se utilizaron células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVECs) tratadas con PMA/Io (Phorbol 12-myristate 13-acetate/ionomicina) con el fin de inducir la actividad NFAT. El estudio concluyó que SiRT1 suprime la actividad transcripcional de NFAT en las HUVECs tratadas con PMA/Io. Además, SiRT1 desacetila principalmente a NFATc3, y en menor medida suprime a NFATc1 y NFATc2. Así mismo, se observó la inhibición de la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2), al parecer también por la reducción de actividad de NFAT mediada por SiRT1(43).

DBC1

DBC1, del inglés Deleted in Breast Cancer 1 (suprimido en el cáncer de mama 1), es una proteína codificada por el gen KIAA1967 localizado en el cromosoma 8 en humanos, en una región del ADN que se encuentra eliminada en pacientes con cáncer de mama. Por esto, se cree

que es un supresor tumoral regulador del gen p53, además de ser un potente regulador negativo de SiRT1 y de la respuesta al estrés celular(44).

En cuanto a su estructura proteica, posee un dominio en cremallera de leucina hacia el extremo N-terminal y un dominio de bobina en espiral en su extremo C-terminal(44). En una investigación realizada en ratones hembras de 8 semanas de edad y homocigotas para los genotipos ApoE^{-/-}/DBC1^{+/+} y ApoE^{-/-}/DBC1^{-/-}, sometidas a una dieta occidental (Western diet; 42% de grasa y 0,2% de colesterol) por un periodo de 20 semanas, se estudió la acumulación de lípidos en la arteria aorta mediante tinción ORO(45). Del análisis de las imágenes de las aortas desde la raíz hasta la bifurcación ilíaca, se evidenció una clara disminución tanto en el número de placas de ateroma como en el área total de placas en los ratones ApoE^{-/-}/DBC1^{-/-} en comparación al grupo ApoE^{-/-}/DBC1^{+/+}. Las aortas de los ratones ApoE^{-/-}/DBC1^{-/-} presentaron una disminución significativa en la formación de placas ateroscleróticas y en la disposición de las mismas, focalizadas en la raíz aórtica (Figura 5). Además se determinó la expresión de marcadores inflamatorios y de daño celular en la pared arterial. Se evidenció una disminución de los indicadores de daño celular p53, p21, p65, F4/80 así como reducción de los marcadores inflamatorios VCAM-1, IL-6 y TNF α en los ratones ApoE^{-/-}/DBC1^{-/-}(45)

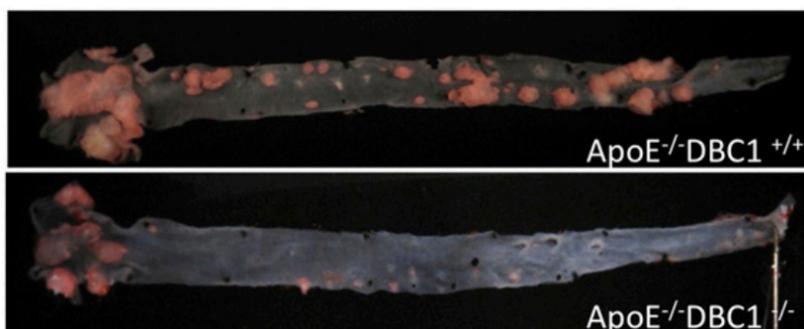


Figura 5. Reducción el área de lesión aterosclerótica en ratones ApoE^{-/-}/DBC1^{-/-}. Tinción ORO en aorta disecada de ratones ApoE^{-/-}/DBC1^{+/+} (panel superior) y ApoE^{-/-}/DBC1^{-/-} (panel inferior) después de 20 semanas de haber sido alimentados con dieta occidental (Western diet; 42% de grasa y 0,2% de colesterol). Extraído de (45).

En el mismo estudio, se compararon parámetros como el peso corporal, la resistencia a la insulina y la sobrevida de ratones DBC1^{-/-} respecto a animales de la misma camada de tipo salvaje (WT), luego de ser alimentados con una dieta alta en grasas durante 12 semanas. Con el objetivo de examinar los efectos de la insulina en los dos grupos, se realizó una prueba de tolerancia a la insulina (inyección i/p de insulina 0,5 unidades/kg) luego de un período de 6 hs de ayuno, y se midieron las concentraciones séricas de glucosa durante las próximas dos horas. Los resultados indicaron que los ratones DBC1^{-/-} respondieron mejor al efecto de la insulina, al observarse un claro descenso de la glicemia en comparación a los ratones WT (Figura 6), por lo que DBC1 podría estar mediando efectos a favor de la resistencia a la insulina, al igual que ocurre en la DM2, al mantener altas las concentraciones de glucosa en sangre.

El estudio concluyó que los ratones $DBC1^{-/-}$ se vuelven más obesos que los ratones WT luego de ser alimentados con una dieta alta en grasas, pero paradójicamente, a pesar de ser más obesos, los ratones $DBC1^{-/-}$ tenían niveles bajos de ácido graso libre en sangre, mantenían alta sensibilidad a la insulina, desarrollaban menos lesión aterosclerótica, menos esteatosis hepática y vivían más tiempo respecto a los ratones WT, por lo que de alguna manera ser $DBC1^{-/-}$ confirió protección ante los efectos nocivos de una dieta alta en grasas, asociada esta al desarrollo de síndrome metabólico y al desarrollo de resistencia a la insulina, lo que contribuye a mantener altas concentraciones de glucosa en sangre(45).

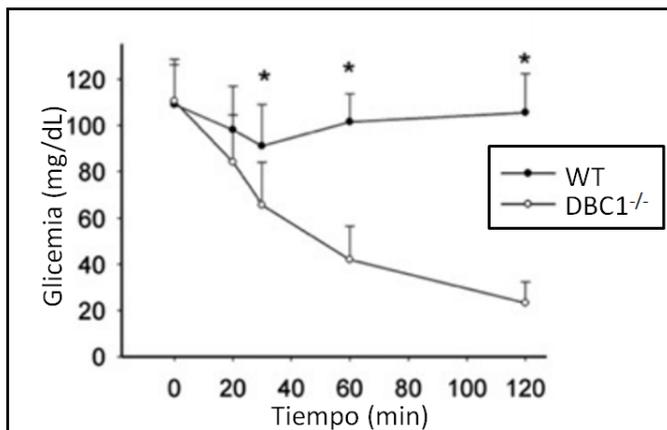


Figura 6: Prueba de tolerancia a la insulina. Ratones salvajes (WT) y $DBC1^{-/-}$ alimentados con una dieta alta en grasas durante 12 semanas. Después de 6 h de ayuno, los ratones se expusieron a 0,5 unidades/kg de insulina i/p, y se controló la glicemia (n = 8 ratones por grupo). * P < 0,05. Modificado de (45).

Interacción SiRT1-DBC1 en la hiperglicemia:

Como se mencionó anteriormente, SiRT1 y DBC1 poseen efectos opuestos a nivel endotelial, donde SiRT1 actúa como un factor protector sobre la aterosclerosis, mientras que DBC1 propicia el desarrollo de esta patología. DBC1 es capaz de inhibir a SiRT1 mediante una interacción directa y para que esto ocurra ambas proteínas deben estar fosforiladas(46).

Si bien aún no hay estudios sobre la actividad SiRT1-DBC1 en células endoteliales o CMLV en el contexto de hiperglicemia, un grupo de investigadores analizó esta relación en células HEPG2, una línea celular derivada de hepatocitos humanos y cómo era esta interacción frente a cambios en la concentración de glucosa(47).

Con el fin de demostrar la interacción entre DBC1 y SiRT1 se transfectaron siARN DBC1 (silenciadores de ARNm específicos de DBC1) a las células HEPG2 y se comparó la actividad de SiRT1 de estas células con un grupo control. Los resultados mostraron que la actividad de SiRT1 aumentó considerablemente con el silenciamiento del ARNm de DBC1(47).

Posteriormente se analizó cómo influye DBC1 en la actividad de SiRT1 en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Para ello se incubaron células a concentraciones bajas y altas de glucosa (5 mM y 30mM, respectivamente) durante 24 horas en la que se logró

evidenciar un claro aumento (3 veces más) de la actividad de SiRT1 en condiciones de baja glucosa (Figura 7A). En el grupo de células tratado con alto contenido de glucosa, la actividad de SiRT1 fue ampliamente superior cuando las células fueron tratadas con siARN DBC1, lo que sugiere que la baja actividad de SiRT1 observada en condiciones de hiperglicemia podría explicarse por un mecanismo de inhibición mediado por DBC1. Por otra parte, en el grupo incubado a bajas concentraciones de glucosa no se observaron cambios en la actividad de SiRT1 ya sea en presencia o ausencia del tratamiento con siARN DBC1, lo que sugiere que DBC1 regula negativamente la actividad de SiRT1 en presencia de altas concentraciones de glucosa (Figura 7B)(47).

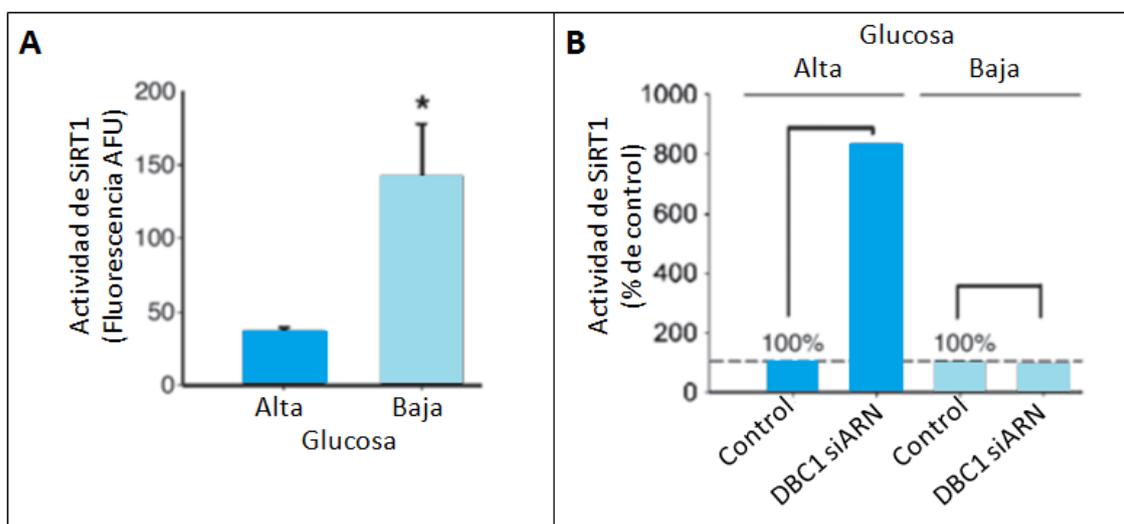


Figura 7. DBC1 controla la actividad SiRT1 dependiente de glucosa en hepatocitos humanos. A: Se expresa la actividad de SiRT1 (expresado en AFU). Las células HEPG2 se cultivaron en medio sin suero durante 24 horas y luego se incubaron durante 24 horas en glucosa baja (5 mM) o alta (30 mM). * P <0,05 (prueba t). B: Se expresa la actividad de SiRT1 en células HEPG2 transfectadas con siARN de DBC1 y luego tratadas con glucosa alta y baja como se describe en A. Modificado de (47).

KLF4 y KLF5

Los KLF, factores similares a Krüppel (del inglés Krüppel-like factors), componen una subfamilia de factores de transcripción (de la familia SP/KLF) integrada por 18 proteínas, numeradas de acuerdo al orden cronológico de su descubrimiento(48)(49). Éstas están involucradas en la regulación de múltiples procesos celulares como crecimiento y proliferación celular, cambio de fenotipo y supervivencia, en una amplia gama de líneas celulares, incluyendo a las CMLV vascular (CMLV) y células endoteliales. Además están asociados a enfermedades como algunos tipos de cáncer y patologías vasculares. Por su papel en el cambio de fenotipo en las CMLV, están relacionados en enfermedades vasculares como la restenosis, la aterosclerosis y el aneurisma(49).

Los genes encargados de su codificación permanecen muy conservados evolutivamente, encontrándose en múltiples especies de vertebrados incluyendo el humano(50). En cuanto a su estructura, estos factores están conformados por tres dedos de zinc que contienen Cisteína²/Histidina² en su extremo C-terminal, un dominio de transactivación (TAD) en su extremo N-terminal, y adyacente a él, un dominio de represión(50). Estos factores regulan la transactivación de múltiples genes y lo hacen mediante la modulación de su estructura a través de procesos de fosforilación, acetilación, metilación y ubiquitinación dependiendo del contexto(50).

KLF4 y KLF5 son dos miembros de esta subfamilia altamente relacionados entre sí, mantienen una distribución muy similar en los tejidos y en general poseen efectos opuestos en la regulación de la transcripción génica(51). En cuanto a la proliferación celular, se ha visto que KLF5 posee un rol predominantemente estimulante, mientras que KLF4 actúa como un inhibidor del crecimiento celular en la mayoría de los contextos(51).

Se ha examinado en fibroblastos de embriones murinos, la expresión de KLF4 en respuesta al daño del ADN. Se observó un aumento de la expresión de KLF4 dependiente del supresor tumoral p53(52). A su vez, el aumento de expresión de KLF4 indujo la expresión de p21, un inhibidor de las ciclinas D1 y B1, lo que determina la detención del ciclo celular en los puntos de transición G1/S y G2/M, respectivamente. Se vio además, que KLF4 no solo es capaz de inhibir el ciclo celular a través de la expresión de p21, sino que también lo hace mediante la inhibición directa de D1 y B1(52). Así mismo, KLF4 activa la transcripción de otros genes adicionales que codifican inhibidores del ciclo celular y suprime diferentes promotores del ciclo celular(51).

KLF5, a diferencia de KLF4, tiene un efecto predominantemente promotor sobre el crecimiento celular. En contraposición con KLF4, el aumento de KLF5 estimula la expresión de los genes que codifican las ciclinas D1 y B1, lo que determina un estímulo para la progresión del ciclo celular(51).

Tanto KLF4 como KLF5, tienen baja expresión en condiciones normales en CMLV diferenciadas, pero se ha visto un incremento de expresión transitoria luego de una lesión vascular, donde participan tanto en la regulación de procesos proliferativos como inflamatorios(49)(50)(51).

KLF4 se expresa constitutivamente en las células endoteliales donde es inducido por citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-1 β y INF- γ , así como por los efectos biomecánicos del estrés del flujo sanguíneo sobre el endotelio(53). A su vez, KLF4 tiene un papel protector vascular y antiinflamatorio en las células endoteliales, al inhibir la activación de NF- κ B e inducir la expresión de eNOS(54). Se ha visto que ratones KLF4^{-/-} condicionales para las células endoteliales, presentan un aumento de la aterosclerosis y trombosis en arterias carótidas. Además, estos ratones exhiben un aumento de la proliferación celular neointimal, así como

mayor acumulación de macrófagos y linfocitos T, y una expresión elevada de moléculas de adhesión como VCAM-1 y E-selectina en arterias lesionadas(55).

Aumentos transitorios de KLF4 inhiben la angiogénesis y la proliferación endotelial mediante el aumento de microARN-15a tanto en las células endoteliales como en las CMLV(54). Sin embargo, el aumento sostenido del mismo produce angiogénesis ineficaz favoreciendo procesos proliferativos patológicos que incluyen patología tumoral y retinopatía proliferativa(54). En la hiperglicemia, hay regulación negativa de KLF4, y si bien se desconoce completamente el mecanismo por lo que esto ocurre, en estas condiciones se observa aumento de la proliferación y diferenciación de CMLV(56).

Ratones KLF5^{-/-} son incompatibles con la vida, por lo que para su estudio se utilizan ratones deficientes heterocigotas (KLF5^{+/-}), que presentan una marcada reducción en su expresión(54). Estos ratones exhiben una reducción en la proliferación de CMLV y formación de neoíntima, además de un descenso de TNF- α , molécula proinflamatoria vinculada a la producción de aterogénesis, enfermedad vascular diabética y oclusión vascular(54)(57).

La sobreexpresión de KLF5 mediada por transfección de adenovirus en CMLV, redujo la expresión de marcadores del fenotipo diferenciado de las CMLV, como son la miocardina y α -actina, lo que las lleva a recobrar la habilidad de proliferar, migrar y sintetizar proteínas de la matriz extracelular, procesos que permiten la remodelación patológica de la pared vascular(56). Adicionalmente, KLF5 incrementa la habilidad de los macrófagos para proliferar y migrar a la pared vascular. En ratones que sobreexpresan KLF5, se observó un aumento de la hiperplasia intimal en la arteria carótida(57).

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Durante esta revisión se abordaron los principales roles que cumple NFAT en el desarrollo de aterosclerosis inducida por diabetes y las funciones que cumplen algunas proteínas afines en dicho contexto, con el fin de encontrar una relación entre ellas y NFAT, que pudieran plantearlos como posibles blancos terapéuticos para disminuir o retrasar las complicaciones macrovasculares en pacientes diabéticos.

Se concluye que:

- La hiperglicemia genera daño celular por aumento del estrés oxidativo. Esto favorece la disfunción endotelial, generando un entorno propenso para el inicio de la placa de ateroma a nivel vascular.
- La activación de NFAT aumenta sólo en las arterias de ratones diabéticos. Dicha activación es dependiente de Ca^{2+} /CaN. Su activación y por tanto translocación al núcleo, promueve la expresión de diferentes moléculas que son marcadores inflamatorios y que participan de la regulación del ciclo celular, promoviendo la proliferación de CMLV.
- El tratamiento *in vivo* con el bloqueador de NFAT (A-285222) inhibe completamente el agravamiento de la aterosclerosis inducido por diabetes en un modelo de ratones con DM1, no teniendo efecto en los ratones no diabéticos. Dicho efecto no fue debido a una inmunosupresión sistémica o a efectos del tratamiento sobre la disminución en los niveles de glucosa ni lípidos. La inhibición de NFAT reduce la expresión de marcadores de activación endotelial y proinflamatorios (IL-6, OPN, MCP-1, ICAM-1, CD-68 y TF) en la pared arterial y disminuye los niveles de IL-6 plasmáticos en los ratones diabéticos.
- La inhibición *in vivo* de NFAT reduce el área de placa de ateroma y el grado de estenosis en la arteria braquiocefálica en un modelo de ratón con DM2. A su vez, la inhibición de NFAT se asocia con la expresión aumentada de la enzima ateroprotectora NOX4 y la disminución de marcadores proinflamatorios (IL-6, OPN, CD68) en la pared arterial de dichos animales.
- SiRT1 es un regulador importante de la inflamación, ya que entre otras cosas funciona como inhibidor transcripcional de NFAT. A nivel vascular, la inhibición de NFATc3 mediante SiRT1 podría disminuir el proceso inflamatorio aterosclerótico.
- DBC1 al igual que SiRT1, es un regulador importante de la inflamación, pero con efectos opuestos, su expresión se ha visto relacionada con el aumento de moléculas proinflamatorias. DBC1 inhibe a SiRT1, impidiendo la inhibición de NFAT por parte de ésta, perpetuando la patología aterosclerótica.

- KLF4 y KLF5 tienen efectos opuestos sobre la proliferación celular y la inflamación. KLF4 actúa como un factor protector en la aterosclerosis al inhibir el ciclo celular, detener la proliferación de CMLV y actuar como antiinflamatorio, mientras que KLF5 actúa de forma antagónica. La actividad de KLF4 se ha visto reducida en diabetes, perdiéndose los efectos protectores de este factor sobre la pared vascular en el contexto de hiperglicemia.

Entendiendo como actúa NFAT y las proteínas afines antes mencionadas, creemos que el bloqueo de NFAT, de DBC1 y de KLF5 podrían tener una gran implicancia como blancos terapéuticos, al retrasar la progresión de la aterosclerosis en pacientes diabéticos. Así mismo, la estimulación de factores protectores como SIRT1 y KLF4, atenuarían los daños provocados por esta patología.

La metodología usada en este trabajo fue la revisión de artículos científicos consultando las bases de datos PubMed, MedLine y The Cochrane Library Plus, sin restricción de fecha, tanto en idioma español como en inglés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhou B, Lu Y, Hajifathalian K, Bentham J, Di Cesare M, Danaei G, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: A pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10027):1513–30. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8)
2. Ministerio de Salud Pública Uruguay. 2^a Encuesta nacional de factores de riesgo de enfermedades no transmisibles. 2013; Available from: http://www.who.int/chp/steps/2DA_ENCUESTA_NACIONAL_final_WEB22.pdf?ua=1
3. Standards of Medical Care in Diabetes 2019. *Diabetes Care*. 2019;42(1):S1-S2.
4. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* [Internet].2003;26(1):S5-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502614>
5. Fowler M. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin Diabetes*. 2011;29(3):116–22.
6. Ross M. *Histología: texto y atlas*. 7th ed. Wolters E de, Kluwer, editors. 2016. 447–465.
7. Seidelmann S, Lighthouse J, Greif D. Development and pathologies of the arterial wall. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(11):1977–99.
8. Wang D, Wang Z, Zhang L, Wang Y. Roles of cells from the arterial vessel wall in atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2017.
9. Puentes Y. Aterosclerosis y sistema aterométrico. *Rev Cub Med Mil*. 2017;45(2):183–94.
10. Abraham M. Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria [Internet]. 2006; Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000200003
11. Insull W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *Am J Med* [Internet]. 2009;122(1):S3–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.10.013>
12. Bentzon J, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852–66.
13. Katakami N. Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25(1):27–39.
14. Yamagishi S, Matsui T. Role of Hyperglycemia-Induced Advanced Glycation End Product (AGE) Accumulation in Atherosclerosis. *Ann Vasc Dis*. 2018;11(3):253–8.
15. Basta G, Schmidt A, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular

- inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res.* 2004;63(4):582–92.
16. Gleissner C, Galkina E, Nadler J, Ley K. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2007;4(3):131–40.
 17. Tsukushi S, Katsuzaki T, Aoyama I, Takayama F, Miyazaki T, Shimokata K, et al. Increased erythrocyte 3-DG and AGEs in diabetic hemodialysis patients: Role of the polyol pathway. *Kidney Int.* 1999;55(5):1970–6.
 18. Macian F. NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(6):472–84.
 19. Hill-Eubanks D, Gomez M, Stevenson A, Nelson M. NFAT regulation in smooth muscle. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13(2):56–62.
 20. Rinne A, Banach K, Blatter L. Regulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in vascular endothelial cells. 2009;47(3):400–410.
 21. Nilsson J, Nilsson L, Chen Y, Molkentin J, Erlinge D, Gomez M. High glucose activates nuclear factor of activated T cells in native vascular smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(4):794–800.
 22. Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal.* 2008;4(1):1–20.
 23. Putney J. Calcium signaling: deciphering the calcium-NFAT pathway. *Curr Biol* [Internet]. 2012;22(3):87–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.030>
 24. Shah M, Brownlee M. Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
 25. Pan M, Xiong Y, Chen F. NFAT gene family in inflammation and cancer. *Curr Mol Med.* 2013;13(4):543–54.
 26. Molkentin J. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res.* 2004;63(3):467–75.
 27. Zetterqvist A, Berglund L, Blanco F, Garcia-Vaz E, Wigren M, Dunér P, et al. Inhibition of Nuclear Factor of Activated T-Cells (NFAT) Suppresses Accelerated Atherosclerosis in Diabetic Mice. *PLoS One.* 2013;8(6).
 28. Trevillyan J, Chiou X, Chen Y, Ballaron S, Sheets M, Smith M, et al. Potent Inhibition of NFAT Activation and T Cell Cytokine Production by Novel Low Molecular Weight Pyrazole Compounds. *J Biol Chem.* 2001;276(51):48118–26.
 29. Nilsson L, Zetterqvist A, Nilsson J, Sigvardsson M, González L, Smith M, et al. Nuclear factor of activated T cells regulates osteopontin expression in arterial smooth muscle in response to diabetes induced hyperglycemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(2):218–24.
 30. Blanco F, Heinonen S, Gurzeler E, Berglund L, Dutius A, Kotova O, et al. In vivo

- inhibition of nuclear factor of activated T-cells leads to atherosclerotic plaque regression in IGF-II/LDLR^{-/-}ApoB100/100 mice. *Diabetes Vasc Dis Res.* 2018;15(4):302–13.
31. Heinonen S, Leppänen P, Kholová I, Lumivuori H, Häkkinen S, Bosch F, et al. Increased atherosclerotic lesion calcification in a novel mouse model combining insulin resistance, hyperglycemia, and hypercholesterolemia. *Circ Res.* 2007;101(10):1058–67.
 32. Williams C, Gooch J. Calcineurin A β regulates NADPH oxidase (Nox) expression and activity via nuclear factor of activated t cells (NFAT) in response to high glucose. *J Biol Chem.* 2014;289(8):4896–905.
 33. Roseto A. El ciclo celular. *Arch argent pediatr.* 1997;95(5):330–41.
 34. Mognol G, Carneiro F, Robbs B, Faget D, Viola J. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell dea and dis.* 2016.
 35. Robbs B, Cruz A, Werneck M, Mognol G, Viola J. Dual Roles for NFAT Transcription Factor Genes as Oncogenes and tumor suppressors. 2008;28(23):7168–81.
 36. Aramburu J, Yaffe M, López C, Cantley L, Hogan P, Rao A. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. 1999;285(5436):2129–33.
 37. Chang H, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in Metabolism Hung. 2012;25(3)211–20.
 38. Kang H, Suh J, Jung Y, Jung J, Kim M, Chung J. Peptide switch is essential for Sirt1 deacetylase activity. *Mol Cell [Internet].* 2011;44(2):203–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.038>
 39. Zhang Y, Cao X, Zhu W, Liu Z, Liu H, Zhou Y, et al. Resveratrol Enhances Autophagic Flux and Promotes Ox-LDL Degradation in HUVECs via Upregulation of SIRT1. *Oxid Med Cell Longev.* 2016.
 40. Chen Z, Peng I, Cui X, Li Y, Chien S, Shyy J. Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(22):10268–73.
 41. Zhang W, Huang Q, Zeng Z, Wu J, Zhang Y, Chen Z. Sirt1 inhibits oxidative stress in vascular endothelial cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2017.
 42. Yang X, Wei J, He Y, Jing T, Li Y, Xiao Y, et al. SIRT1 inhibition promotes atherosclerosis through impaired autophagy. *Oncotarget.* 2017;8(31):51447–61.
 43. Jia Y, Lu J, Huang Y, Liu G, Gao P, et al. The involvement of NFAT transcriptional activity suppression in SIRT1 mediated inhibition of COX-2 expression induced by PMA/Ionomycin. *PLoS One.* 2014;9(5):1–11.
 44. Lei Y, Lekha N, Alegre M. DBC1 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2015;39(1):9–19.
 45. Escande C, Nin V, Pirtskhalava T, Chini C, Tchkonja T. Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. 2015;64(January):12–22.

46. Bae H, Chang Y, Noh J, Kim J, Eun J, Jung K, et al. DBC1 does not function as a negative regulator of SIRT1 in liver cancer. *Oncol Lett.* 2012;4(5):873–7.
47. Escande C, Chini C, Nin V, Dykhouse K, Novak C, Levine J, et al. Deleted in breast cancer–1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet– induced liver steatosis in mice. 2010;120(2).
48. Pei J, Grishin N. A new family of predicted krüppel-like factor genes and pseudogenes in placental mammals. *PLoS One.* 2013;8(11):1–11.
49. Haldar S, Ibrahim O, Jain M. Kruppel-like factors (KLFs) in muscle biology. 2014;27(4):1–19.
50. Ghaleb A, Yang V. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
51. Ghaleb A, Nandan M, Chanchevalap S, Brian W, Hisamuddin I, et al. Krüppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation. 2005;15(2):92–6.
52. Zhang W, Geiman D, Shields J, Dang D, Mahatan C, Kaestner K, et al. The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21(WAF1)/(Cip)1 promoter. *J Biol Chem.* 2000;275(24).
53. Hamik A, Lin Z, Kumar A, Balcells M, Sinha S, Katz J, et al. Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *J Biol Chem.* 2007;282(18).
54. Fan Y, Lu H, Liang W, Hu W, Zhang J, Chen Y. Krüppel-like factors and vascular wall homeostasis. *J Mol Cell Biol.* 2017;9(5):352–63.
55. Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, Hayashi M. Deletion of Krüppel-like factor 4 in endothelial and hematopoietic cells enhances neointimal formation following vascular injury. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(1):1–13.
56. Cheng Y, Liu X, Yang J, et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circulation Research.* 2010;105(2):158–66.
57. Sweet D, Fan L, Hsieh P, Jain M. Krüppel-like factors in vascular inflammation: mechanistic insights and therapeutic potential. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5(Feb):1–17.