

Efectos de la combinación rosiglitazona-atorvastatina sobre la expresión de genes implicados en la captación y en el eflujo de colesterol en el macrófago

G. Llaverías, D. Lacasa y M. Alegret

Unidad de Farmacología. Departamento de Farmacología y Química Terapéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

Fundamento y objetivo. Las anomalías lipídicas constituyen un importante factor de riesgo cardiovascular en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2. El tratamiento con rosiglitazona, si bien mejora el control de la glucemia y reduce la resistencia a la insulina, produce incrementos moderados en las concentraciones de colesterol LDL (cLDL) en estos pacientes. Un estudio clínico reciente ha demostrado que la terapia combinada con atorvastatina y rosiglitazona resulta altamente beneficiosa, pues la estatina contrarresta el incremento de cLDL producido por la rosiglitazona. El objetivo del presente estudio ha sido determinar el efecto de dichos fármacos sobre la expresión de diversos genes implicados en la captación o en el eflujo de colesterol en el macrófago, con la finalidad de evaluar si el tratamiento combinado resulta beneficioso en las fases iniciales de la formación de la placa de aterosclerosis.

Métodos. Se incubaron macrófagos THP-1 de forma simultánea con 150 µg/ml de LDL acetiladas y los fármacos (atorvastatina 5 µM, rosiglitazona 2 µM o la combinación de ambos) durante 24 h. Los valores de ARNm se determinaron mediante

reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.

Resultados. Los niveles de ARNm del receptor MSR-1 no resultaron modificados por el tratamiento con atorvastatina; en cambio, el tratamiento con rosiglitazona o con la combinación atorvastatina-rosiglitazona produjo incrementos similares (46 y 39%, respectivamente, $p < 0,05$) en la expresión de este gen. En cuanto al receptor CD36, el tratamiento con atorvastatina produjo una reducción no significativa en los niveles de ARNm, mientras que el tratamiento con rosiglitazona produjo un marcado incremento (68%, $p < 0,05$). Al combinar ambos fármacos, se observa una atenuación de la respuesta inducida por rosiglitazona, ya que, aunque existe un cierto incremento en los niveles de ARNm de CD36 (34%), no se llega a alcanzar la significación estadística. Los niveles de ARNm de CLA-1, caveolina-1, esterol 27-hidroxilasa, ABCA1 y ABCG1 no resultaron modificados significativamente tras ninguno de los tratamientos.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que la combinación de rosiglitazona y atorvastatina puede resultar beneficiosa, ya que atenúa el incremento en la expresión de CD36 producido por rosiglitazona.

Este estudio fue parcialmente subvencionado por FPCNL, CICYT (SAF00-0201 y BFI2002-05167), FISS (01/0075-01) y Generalitat de Catalunya (2001SGR 00141). Gemma Llaverías es becaria de la Universidad de Barcelona.

Correspondencia: Dra. Marta Alegret Jordà.
Unidad de Farmacología. Facultad de Farmacia.
Avda. Diagonal 643. 08028 Barcelona. España.
Correo electrónico: alegret@ub.edu

Palabras clave:
Rosiglitazona. Atorvastatina. CD36. MSR-1. ABCA1. ABCG1. CLA-1. Caveolina-1. Esterol-27-hidroxilasa. Macrófagos.

EFFECTS OF ROSIGLITAZONE IN COMBINATION WITH ATORVASTATIN ON THE EXPRESSION OF GENES RELATED TO CHOLESTEROL UPTAKE AND EFFLUX IN MACROPHAGES

Background and objective. Lipid abnormalities are a key cardiovascular risk factor in patients with type 2 diabetes mellitus. Rosiglitazone is effective in improving glycemic control and in reducing insulin resistance, but may moderately increase low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels. A recent clinical study has demonstrated that the combination of rosiglitazone plus atorvastatin provides additional benefits, as the statin counterbalances the increase in LDL cholesterol caused by rosiglitazone. The aim of the present study was to determine the effects of these drugs on an array of genes related to cholesterol uptake and efflux in the macrophage, with the aim of evaluating whether this combination is beneficial in the initial steps of atherosclerotic plaque formation.

Methods. THP-1 macrophages were simultaneously exposed to acetyl-LDL (150 µg/ml) and the drugs (5 µM atorvastatin, 2 µM rosiglitazone or a combination of both) for 24 h. Relative levels of specific mRNAs were assessed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The results are expressed as the mean ± SD of 3 experiments.

Results. mRNA levels of the MSR-1 receptor were not modified after atorvastatin treatment, while incubation with rosiglitazone or with the combination rosiglitazone-atorvastatin significantly increased expression of this gene (46% and 39%, respectively, $p < 0.05$). On the other hand, CD36 mRNA levels were slightly reduced by atorvastatin, while rosiglitazone caused a significant increase (68%, $p < 0.05$). When macrophages were exposed to a combination of both drugs, the induction caused by rosiglitazone was decreased, achieving only a nonsignificant, 34% increase in CD36 mRNA levels. Finally, none of the treatments modified mRNA expression of CLA-1, caveolin-1, sterol 27-hydroxylase, ABCA1 or ABCG1.

Conclusions. These results suggest that a combination of rosiglitazone and atorvastatin may be beneficial, as the increase in CD36 expression caused by rosiglitazone alone is attenuated by atorvastatin.

Key words:

Rosiglitazone. Atorvastatin. CD36. MSR-1. ABCA1. ABCG1. CLA-1. Caveolin-1. Sterol-27-hydroxylase. Macrophages.

Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 afecta en la actualidad a casi 1,5 millones de personas en España¹. Representa un importante problema sanitario, puesto que, además, su incidencia se ha incrementado de forma continuada durante la pasada década². Los pacientes diabéticos presentan un elevado riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, debido, entre otros factores, a la mayor prevalencia de dislipemia que presentan en comparación con la población general³. Entre las alteraciones lipídicas cuantitativas destacan la hipertrigliceridemia, asociada a niveles elevados de VLDL, disminución del colesterol HDL (cHDL) y alteraciones variables en los niveles de colesterol LDL (cLDL); por otra parte, en el curso de la diabetes tipo 2 se producen también anomalías cualitativas, como el enriquecimiento en LDL pequeñas y densas, el aumento de LDL oxidadas y de la glicación de apolipoproteínas⁴. Diversos estudios han demostrado que la corrección de estas anomalías lipídicas se asocia a una reducción significativa del riesgo de enfermedades cardiovasculares en pacientes con diabetes tipo 2⁵.

Las tiazolidindionas constituyen una nueva clase de antidiabéticos orales que han demostrado su eficacia para mejorar el control de la glucemia, reducir la resistencia a la insulina y preservar la función de las células beta pancreáticas⁶. El mecanismo molecular por el cual las tiazolidindionas ejercen estos efectos es la modificación de la actividad transcripcional del receptor PPARγ⁷. Recientemente se ha aprobado en España la utilización de un nuevo fármaco de este grupo, la rosiglitazona⁸. Diversos estudios clínicos han puesto en evidencia que el tratamiento de pacientes diabéticos con rosiglitazona produce incrementos entre un 7 y un 18% en las concentraciones de cLDL^{9,10}. La propia dislipemia de base que presentan muchos diabéticos, sumada al hecho de que la rosiglitazona puede aumentar aún más los niveles de cLDL, abre la posibilidad de que estos pacientes puedan beneficiarse de una terapia combinada que incluya el uso de una estatina junto con la rosiglitazona. En este sentido, los resultados de un reciente estudio clínico demuestran que la adición de atorvastatina no modifica el efecto de la rosiglitazona sobre el con-

trol de la glucemia, y que, en cambio, consigue contrarrestar el efecto de las tiazolidindionas sobre el cLDL, el cual se reduce hasta valores inferiores a 100 mg/dl¹¹.

Los macrófagos constituyen uno de los tipos celulares más estrechamente implicados en todas las fases del proceso aterosclerótico, desde su inicio y desarrollo hasta los procesos que finalmente dan lugar a la ruptura de las placas de ateroma¹². Así, los macrófagos expresan receptores *scavenger* implicados en la captación de LDL modificadas, principalmente receptores *scavenger* de clase A (SR-A o MSR) y el receptor CD36¹³. Debido a la captación continuada de LDL modificadas a través de estos receptores, los macrófagos acumulan en su interior grandes cantidades de colesterol, que almacenan en forma de ésteres gracias a la actividad del enzima acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT). Para mantener la homeostasis celular, los macrófagos, que no son capaces de degradar el colesterol, deben exportarlo a aceptores extracelulares que median su transporte hacia el hígado, principalmente HDL y apo A-1. La conversión de colesterol en metabolitos más polares, por acción del enzima esterol 27-hidroxilasa (CYP27), facilita su salida del macrófago. Así, el 27-hidroxicolesterol es exportado vía HDL, mientras que productos más oxidados pueden incluso ser eliminados independientemente de la presencia de aceptores en el medio¹⁴.

En el proceso de salida de colesterol desde el macrófago intervienen principalmente los transportadores ABCA1 y G1, que vehiculizan el colesterol hacia la apo A-1¹⁵, y también el receptor CLA-1, homólogo humano del receptor *scavenger* tipo BI (SR-BI), en este caso vía HDL¹⁶.

Varios de los receptores mencionados anteriormente están localizados en microdominios de la membrana plasmática denominados caveolas, por ejemplo SR-BI, CD36¹⁷ y ABCA1¹⁸. Por otra parte, la expresión de la caveolina-1, marcador de las caveolas, está regulada por los niveles de colesterol celular¹⁹. Recientemente se ha descrito que la caveolina-1 puede regular de forma negativa el proceso de captación selectiva de ésteres de colesterol mediada por SR-BI²⁰.

Teniendo en cuenta la posibilidad real de utilizar en clínica la combinación rosiglitazona-atorvastatina en pacientes con dislipemia y diabetes tipo 2, el objetivo de este trabajo ha sido determinar el efecto de dichos fármacos sobre la expresión de una serie de genes (*MSR-1*, *CD36*, *CLA-1*, *CYP27*, *ABCA1*, *ABCG1* y *CAVEOLINA-1*), implicados en la captación o en el eflujo de colesterol en el macrófago,

con la finalidad de comprobar si la combinación resulta beneficiosa a este nivel.

Material y métodos

La atorvastatina utilizada en este estudio ha sido proporcionada por Parke-Davis, Inc, Ann Arbor, MI (actualmente Pfizer), y la rosiglitazona, por GlaxoSmithkline, UK. Los reactivos usados para el cultivo celular son de Gibco, Invitrogen Corporation (Paisley, UK), con excepción del suero bovino fetal y del 4-beta phorbol 12 beta miristato 13 alfa acetato (PMA), obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El reactivo Ultraspect utilizado para la obtención del ARN total se obtuvo de Biotecx (Houston, TX). Los reactivos usados para la reacción de RT-PCR fueron de Invitrogen (Paisley, UK), a excepción de los *random hexamers* y los oligonucleótidos específicos o *primers* obtenidos de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) y el α -[³²P]dATP de Amersham Biosciences (Freiburg, Alemania). El resto de reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) o de Panreac Química (España).

Lipoproteínas

Las LDL (d = 1.006-1.063 g/ml) se obtuvieron a partir de plasma de donantes sanos por ultracentrifugación secuencial²¹, se dializaron en tampón fosfato salino (PBS), y su concentración proteica se valoró por el método de Bradford²² usando albúmina sérica bovina como estándar. Las LDL se acetilaron según Basu et al²³, se dializaron y se procedió a su concentración mediante el sistema de filtros Millipore Centrplus²⁴. El grado de acetilación fue confirmado por el aumento en movilidad electroforética respecto a las LDL nativas²⁵.

Cultivo celular

La línea celular de leucemia monocítica humana THP-1 se obtuvo de la European Collection of Cell Cultures (ECACC), y se mantuvo en medio RPMI 1640 con 25 mM de Hepes Buffer, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum, EE.UU.), un 1% de L-glutamina 200 mM y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, a 37 °C y 5% de CO₂. La diferenciación de monocitos a macrófagos se realizó por exposición de las células a 50 ng/ml de PMA durante 72 h²⁶. Después de un período de estabilización de 16 h, las células se trataron simultáneamente con 150 µg/ml de ac-LDL y el fármaco o fármacos, durante 24 h. Los fármacos se añadieron disueltos en DMSO, de forma que la concentración final en el medio de cultivo fuera del 0,1% de DMSO. Las concentraciones de fármaco utilizadas (5 µM de atorvastatina y 2 µM de rosiglitazona) se eligieron en función de estudios anteriores realizados en macrófagos²⁶⁻²⁸, teniendo en cuenta que el tratamiento no modificase la viabilidad celular, determinada por el método MTT²⁹.

Preparación y análisis del ARN

El ARN total se aisló mediante el reactivo Ultraspect, siguiendo las indicaciones del fabricante. Los valores relativos de ARN mensajero (ARNm) se determinaron mediante la reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 0,5 µg de ARN total mediante su incubación con 125 ng de *random hexamers* y 200 U de la enzima M-MLV-transcriptasa reversa en un tampón que contenía 50 mM de Tris-HCl, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de ditiotretol, 20 U de RNasaOut y 0,5 mM de cada dNTP en un volumen final de 20 µl. La reacción se

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos específicos o *primers*, tamaño de los fragmentos amplificados y número de ciclos de amplificación para cada uno de los genes estudiados

Gen		Secuencias de oligonucleótidos	Tamaño fragmento amplificado (pb)	N.º de ciclos de amplificación
<i>MSR-1</i>	Sentido	5'-TCCTCAGCTCAGGGACATGGG-3'	362	21
	Antisentido	5'-CGATCTCCTTTTCACCCGGG-3'		
<i>CD36</i>	Sentido	5'-CTGTGACCGAAGTGTGGGCT-3'	361	21
	Antisentido	5'-GAAGATGGCACCATTGGGCTG-3'		
<i>CLA-1</i>	Sentido	5'-ACGACACCGTGTCTTCCTCG-3'	509	23
	Antisentido	5'-CGGGCTGTAGAACTCCAGCGA-3'		
<i>CAVEOLINA-1</i>	Sentido	5'-ACAAGCCCAACAACAAGGCCA-3'	245	30
	Antisentido	5'-GAGGGCAGACAGCAAGCGGTA-3'		
<i>CYP-27</i>	Sentido	5'-GCCATGGGCAGCCTGCCTGA-3'	502	22
	Antisentido	5'-CTTGCGAGGAGTAGCTGCATC-3'		
<i>ABCA1</i>	Sentido	5'-GGAGGCAATGGCACTGAGGAA-3'	181	20
	Antisentido	5'-CCTGCCTTGTGGCTGGAGTGT-3'		
<i>ABCG1</i>	Sentido	5'-CCATGATGGTGTCTGGCAGATC-3'	206	24
	Antisentido	5'-GCTGGTGGGCTCATCGAAGAA-3'		
<i>GAPDH</i>	Sentido	5'-CAGTCCATGCCATCACTGCCA-3'	302	18
	Antisentido	5'-AGGTGGAGGAGTGGGTGTCGC-3'		

llevó a cabo a 37 °C durante 1 h. Una alícuota de 5 µl de la reacción de RT se utilizó para la reacción de amplificación de PCR, que contenía en un volumen final de 50 µl: 0,5 µg de cada oligonucleótido específico, 200 µM de dNTPs, 1 U de TaqDNA polimerasa y 0,25 µCi de α -[³²P]dATP en tampón 20 mM Tris-HCl (pH = 8,5) y 2,5 mM de MgCl₂. Para evitar posibles hibridaciones inespecíficas, el ADNc y la Taq polimerasa se separaron de los oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido) y dNTPs mediante una capa de parafina; de este modo, sólo entran en contacto cuando la parafina funde a 60 °C. La reacción de PCR se realizó en un termociclador (MJ Research, WaterTown, MA) equipado con un sistema Peltier y una sonda de temperatura. La reacción se inició con una desnaturalización a 94 °C durante 1 min, seguida del ciclo de amplificación consistente en una desnaturalización a 92 °C durante 1 min, una hibridación con los oligonucleótidos específicos a 60 °C durante 1 min y 15 s y una etapa de síntesis a 72 °C durante 1 min y 50 s. La reacción se terminó, al final del último ciclo de amplificación, con 5 min de síntesis final a 72 °C. Para cada uno de los genes estudiados se realizaron estudios preliminares de número de ciclos de amplificación y cantidad de ADNc a amplificar para determinar las condiciones óptimas de trabajo (por debajo del límite de saturación). Las secuencias específicas de los oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados, así como el tamaño del fragmento amplificado y el número de ciclos de amplificación para cada gen, se presentan en la tabla 1. Un total de 5 µl de la reacción de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% en 1X Tris borato-EDTA, y los productos de la amplificación fueron visualizados mediante autorradiografía (RX-OMAT S Kodak). La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría (Vilbert Lourmat Imaging). Este método permite una cuantificación relativa de los niveles de ARNm de cada uno de los genes estudiados normalizados con los del gen control, en nuestro caso la *GAPDH*.

Los resultados corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon mediante el test ANOVA combinado con el test de

Student-Newman-Keuls, utilizando el programa informático GraphPad Instat.

Resultados

Efecto del tratamiento sobre la expresión de receptores relacionados con la captación de LDL modificadas

Monocitos THP-1, previamente diferenciados a macrófagos por exposición a ésteres de forbol, se trataron de forma simultánea con los fármacos (atorvastatina 5 µM, rosiglitazona 2 µM o la combinación de ambos) junto con 150 µg/ml de LDL acetiladas durante 24 h, y se analizó la expresión de diversos genes implicados en la captación de colesterol por el macrófago: *MSR-1*, *CD36* y *CLA-1*.

Los niveles de ARNm del receptor *MSR-1* no resultaron modificados por el tratamiento con atorvastatina, en comparación con macrófagos expuestos a LDL acetiladas en ausencia de fármaco; en cambio, el tratamiento con rosiglitazona o con la combinación atorvastatina-rosiglitazona produjo incrementos similares (46 y 39%, respectivamente, $p < 0,05$) en la expresión de este gen (fig. 1).

El tratamiento con atorvastatina produjo una reducción no significativa del 21% en los niveles de ARNm de *CD36*; por el contrario, el tratamiento con rosiglitazona produjo un marcado incremento (68%, $p < 0,05$). Al combinar ambos fármacos, se observa una atenuación de la respuesta inducida por rosiglitazona, ya que aunque existe un cierto incremento en los niveles de ARNm de *CD36* (34%), no se llega a alcanzar la significación estadística (fig. 2).

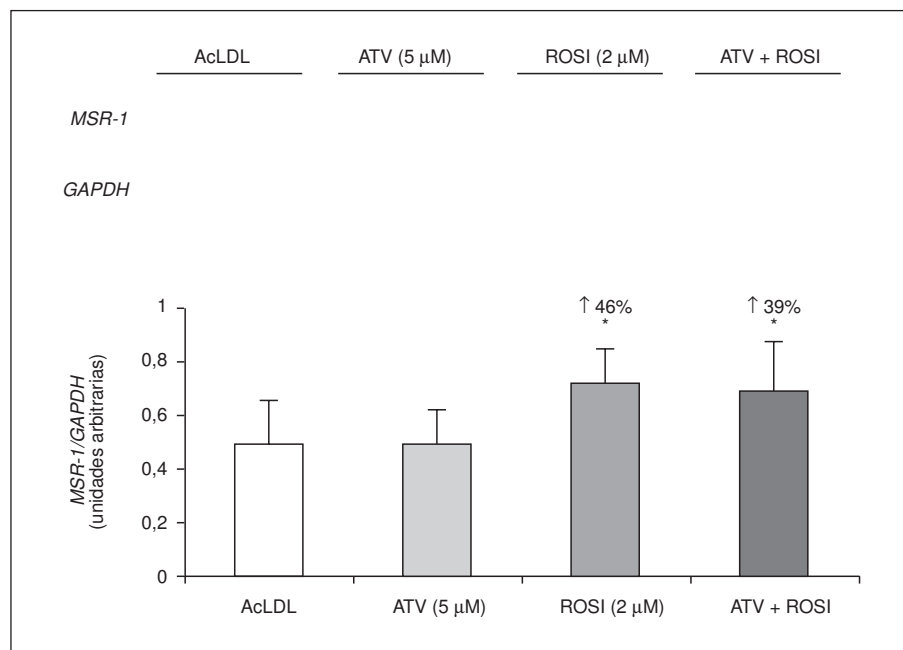


Figura 1. Efecto del tratamiento con atorvastatina, rosiglitazona y una combinación de ambos fármacos sobre los niveles de ARNm de *MSR-1* en macrófagos THP-1 tratados simultáneamente con LDL acetiladas. Las células fueron incubadas de forma simultánea con 150 µg/ml de acetil-LDL y el fármaco o fármacos durante 24 h. Se analizaron 0,5 µg de ARN total mediante RT-PCR. La figura muestra una autorradiografía representativa del ensayo y la cuantificación relativa de los niveles de ARNm normalizados con los del gen control *GAPDH*. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias y corresponden a la media ± desviación estándar de 3 experimentos realizados por triplicado. *p < 0,05.

Efecto del tratamiento sobre la expresión de moléculas implicadas en el eflujo de colesterol desde el macrófago

Ninguno de los fármacos ensayados, ni por separado ni en combinación, produjo modificaciones significativas en la expresión de diversos genes relacionados de una forma u otra con la salida de colesterol del macrófago (tabla 2): *CAVEOLINA-1*, marca-

dor de las caveolas; *CYP-27*, responsable de la formación de metabolitos más polares y más fácilmente exportables de colesterol; *CLA-1*, homólogo humano de *SR-BI*, relacionado con la vehiculización del colesterol libre hacia las HDL; por último, los transportadores ABC (*ABCA1* y *ABCG1*), implicados en el eflujo de colesterol hacia la apolipoproteína A-I, tampoco sufrieron alteraciones en su expresión.

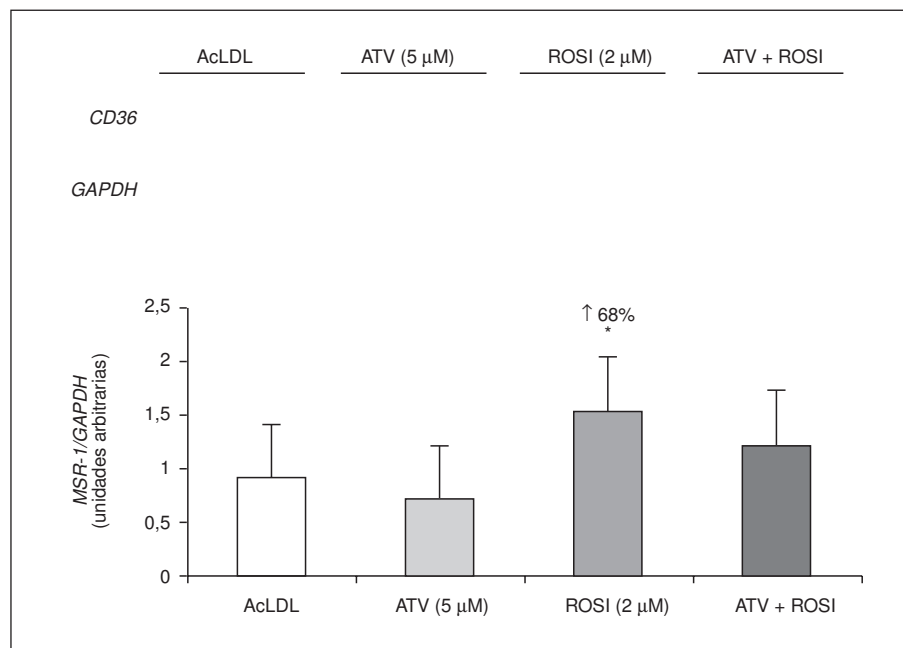


Figura 2. Efecto del tratamiento con atorvastatina, rosiglitazona y una combinación de ambos fármacos sobre los niveles de ARNm de *CD36* en macrófagos THP-1 tratados simultáneamente con LDL acetiladas. Las células fueron incubadas de forma simultánea con 150 µg/ml de acetil-LDL y el fármaco o fármacos durante 24 h. Se analizaron 0,5 µg de ARN total mediante RT-PCR. La figura muestra una autorradiografía representativa del ensayo y la cuantificación relativa de los niveles de ARNm normalizados con los del gen control *GAPDH*. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias y corresponden a la media ± desviación estándar de 3 experimentos realizados por triplicado. *p < 0,05.

Tabla 2. Efecto de la atorvastatina, la rosiglitazona y su combinación sobre los niveles de ARNm de *CLA-1*, *CAVEOLINA-1*, *CYP-27*, *ABCA1* y *ABCG1* en macrófagos tratados simultáneamente con LDL acetiladas

	<i>CLA-1</i>	<i>CAVEOLINA-1</i>	<i>CYP-27</i>	<i>ABCA1</i>	<i>ABCG1</i>
AcLDL	0,777 ± 0,259	0,614 ± 0,071	1,947 ± 0,531	1,153 ± 0,129	1,077 ± 0,120
ATV (5 µM)	0,806 ± 0,240	0,605 ± 0,063	2,264 ± 0,513	1,048 ± 0,203	1,064 ± 0,161
ROSI (2 µM)	0,822 ± 0,259	0,687 ± 0,106	1,784 ± 0,661	1,337 ± 0,321	1,249 ± 0,288
ATV + ROSI	0,848 ± 0,280	0,645 ± 0,093	2,187 ± 0,855	1,173 ± 0,277	1,079 ± 0,174

Las macrófagos THP-1 se trataron de forma simultánea con 150 µg/ml de acetil-LDL y el fármaco o fármacos durante 24 h. Se analizaron 0,5 µg de ARN total mediante RT-PCR. La tabla muestra la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de *CLA-1*, *CAVEOLINA-1*, *CYP-27*, *ABCA1* y *ABCG1* normalizados con los del gen control *GAPDH*. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias y corresponden a la media ± desviación estándar de 3 experimentos realizados por triplicado.

Discusión

El objetivo principal del presente estudio ha sido determinar si la combinación de rosiglitazona y atorvastatina, de posible aplicación en pacientes con diabetes tipo 2 y dislipemia¹¹, produce efectos beneficiosos en las fases iniciales de la formación de la placa de ateroma. Para ello, se ha escogido uno de los tipos celulares implicados de forma más directa en la génesis de las células espumosas y las estrías grasas: el macrófago¹². El balance de los niveles de colesterol en estas células depende, por una parte, de la captación de LDL modificadas, y, por otra, de los mecanismos desarrollados para eliminar el colesterol acumulado, excretándolo hacia el medio extracelular, en presencia o en ausencia de aceptores adecuados. En el primer caso, el proceso está mediado por la expresión de receptores *scavenger* en la superficie del macrófago, tales como *MSR-1* y *CD36*.

El receptor *MSR-1*, receptor *scavenger* de macrófago tipo 1, también denominado receptor *scavenger* de clase A tipo 1, fue el primer receptor de este tipo clonado y caracterizado³⁰. Presenta una estructura trimérica con varios dominios estructurales, entre los que se incluye una región implicada en el reconocimiento de un amplio rango de ligandos; éstos son principalmente sustancias polianiónicas, entre las que se encuentran lipoproteínas modificadas, como las LDL oxidadas y acetiladas³¹. Poco después de su clonación, se demostró la presencia de *MSR-1* en los macrófagos de lesiones ateroscleróticas³², y en diversos estudios *in vitro* se observó que la captación de lipoproteínas modificadas, mediada por este receptor en macrófagos, conducía a la formación de células espumosas³³. La implicación de *MSR-1* en la aterogénesis pareció confirmarse con los estudios de Suzuki et al³⁴, en los que se observó que al cruzar ratones deficientes en *MSR-1* con ratones deficientes en apo E se reducía cerca de un 60% la formación de lesiones ateroscleróticas, en comparación con ra-

tones deficientes en apo E pero que expresaban normalmente *MSR-1*.

En el presente trabajo se ha demostrado que el tratamiento de macrófagos THP-1 con rosiglitazona 2 µM produce un incremento significativo en la expresión de *MSR-1*. En cambio, el tratamiento con atorvastatina 5 µM no produce ningún efecto sobre los niveles de ARNm de *MSR-1*. Esta falta de efecto probablemente se relaciona con el hecho de que en nuestros experimentos se han utilizado macrófagos plenamente diferenciados; así, se ha descrito que el tratamiento con lovastatina atenúa la inducción de *MSR-1* que se produce durante el proceso de diferenciación del monocito, pero no tiene efecto en macrófagos diferenciados³⁵. La adición de atorvastatina no modifica el efecto de rosiglitazona, ya que se continúa detectando un incremento significativo en los niveles de ARNm de *MSR-1*.

En estudios previos en cultivos primarios de macrófagos humanos, se ha descrito que el tratamiento con glitazonas no modifica la expresión de ARNm de *MSR-1*^{36,37}. En nuestro caso, los fármacos se han añadido durante el período de exposición a LDL acetiladas, las cuales son captadas de forma mayoritaria por este receptor en células THP-1³⁸; es evidente que el efecto farmacológico varía notablemente en función del grado de diferenciación o de carga lipídica del macrófago²⁶, lo que puede explicar, al menos en parte, las discrepancias de nuestros resultados con los de Moore y Vosper^{36,37}. En cuanto al posible significado fisiológico de la inducción de *MSR-1*, debe tenerse en cuenta que la premisa de que *MSR-1* actúa como promotor de la aterosclerosis es cuestionable³¹. Así, en un estudio reciente se ha evidenciado que la expresión de *MSR-1* en macrófagos de ratones deficientes en el receptor LDL reduce significativamente la extensión y formación de lesiones ateromatosas³⁹. De hecho, las funciones de *MSR-1* no se limitan a la captación de LDL modificadas, sino que presenta otras

actividades biológicas (mediación de la adhesión a sustratos o interacción con vías de señalización intracelular) que pueden estar relacionadas con la reducción de la aterosclerosis³⁹. Por tanto, el efecto de la rosiglitazona sobre la expresión de *MSR-1* en macrófagos no implica necesariamente la promoción del desarrollo de lesiones ateromatosas.

De igual modo, la inducción de *CD36* por parte de agonistas PPAR γ fue inicialmente evaluada como un fenómeno negativo, puesto que hipotéticamente favorecería la formación de células espumosas⁴⁰. Estudios más recientes sugieren que el incremento en la expresión de *CD36* no implica necesariamente una mayor acumulación de colesterol en el macrófago^{36,41}; sin embargo, no puede descartarse un papel proaterogénico, ya que, al menos en ciertas condiciones, la incubación de macrófagos THP-1 con glitazonas provoca un aumento significativo en los niveles de colesterol intracelular⁴². En este sentido, puede destacarse que los resultados de nuestro trabajo sugieren que la combinación de rosiglitazona y atorvastatina puede resultar beneficiosa, ya que atenúa el incremento en la expresión de *CD36* producido por la rosiglitazona. De hecho, se observa que la incubación de las células con atorvastatina solamente provoca una cierta reducción en la expresión de *CD36* en los macrófagos. El efecto no llega a alcanzar la significación estadística, posiblemente porque, igual que sucede con *MSR-1*, la reducción que provocan las estatinas sobre la expresión de *CD36* es mucho más evidente en monocitos o macrófagos poco diferenciados^{35,43}. Sin embargo, al combinar con rosiglitazona, el efecto de atorvastatina sobre la expresión de *CD36* se pone de manifiesto. Así, mientras que la incubación con rosiglitazona sola produce un aumento del 68% en los niveles de ARNm de *CD36* ($p < 0,05$), al añadir atorvastatina la inducción sólo alcanza un 34%, y pierde la significación estadística respecto a los niveles de ARNm en células control.

Respecto a los receptores implicados en la salida o eflujo de colesterol desde el macrófago, el tratamiento con atorvastatina, rosiglitazona o la combinación de ambos fármacos no produce, al menos en nuestras condiciones de trabajo, ninguna alteración significativa en su expresión. En cualquier caso, la información respecto el efecto de estos fármacos sobre los diversos genes estudiados o bien es inexistente (caso de *CAVEOLINA-1* o esterol-27 hidroxilasa) o bien es contradictoria (SR-BI, transportadores ABC). En el caso de *ABCA1*, diversos autores han descrito un incremento en su expresión tras el tratamiento de macrófagos con agonistas PPAR γ , a través de una cascada transcripcional mediada por

LXR α ^{28,44,45}. Sin embargo, Claudel et al⁴⁶ no observaron ningún efecto sobre los niveles de ARNm de *ABCA1* en monocitos RAW 264.7 tratados con agonistas PPAR γ . Asimismo, Akiyama et al²⁸ demostraron, tanto en macrófagos control como deficientes en PPAR γ , que el tratamiento con rosiglitazona no afectaba la expresión de *ABCA1*, e incluso, en el caso de troglitazona, ésta resultaba inhibida.

En cuanto a *CLA-1*, el homólogo humano de SR-BI, su expresión no resultó modificada tras ninguno de los tratamientos, al menos en nuestras condiciones experimentales. Chawla et al²⁷ tampoco observaron cambios en la expresión de SR-BI en macrófagos derivados de células embrionarias pluripotenciales. Sin embargo, Chinetti et al⁴⁷ observaron que el tratamiento de macrófagos derivados de monocitos humanos con rosiglitazona produjo un marcado incremento en los niveles de proteína *CLA-1*. Una posible explicación para esta discrepancia reside en la utilización de distintos modelos celulares que pueden responder de forma diferente al tratamiento. Así, en cultivos primarios de monocitos humanos se produce una inducción de *CLA-1* durante el proceso de diferenciación, mientras que en la línea celular THP-1, la expresión de *CLA-1* resulta inhibida tras su diferenciación a macrófagos por exposición a ésteres de forbol⁴⁸.

En conclusión, en las condiciones utilizadas en este trabajo (macrófagos THP-1 tratados con atorvastatina 5 μ M, rosiglitazona 2 μ M o la combinación de ambos, simultáneamente con LDL acetiladas) no se produjeron modificaciones en la expresión de ninguno de los genes estudiados relacionados con el proceso de eflujo de colesterol del macrófago (*CLA-1*, *ABCA1* y G1, *CAVEOLINA-1* o *CYP-27*). En cambio, se observó un incremento significativo en los niveles de ARNm de *MSR-1* tras el tratamiento con rosiglitazona, sola o en combinación con atorvastatina, y una atenuación del efecto inductor de la glitazona sobre la expresión de *CD36* cuando se combina con atorvastatina. Teniendo en cuenta las controversias existentes sobre el papel proaterogénico o antiaterogénico de estos receptores, resulta necesario realizar más estudios para poder concluir si esta combinación de fármacos, de muy probable uso en clínica, es o no beneficiosa en el macrófago, célula clave en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

Bibliografía

1. Tamargo J. Perfil farmacológico de la rosiglitazona. Clin Invest Arterioscler 2002;14:1-9.
2. Weissman P. Reappraisal of the pharmacologic approach to treatment of type 2 diabetes mellitus. Am J Cardiol 2002;90:42G-50G.

3. Masana L. Mecanismos de la dislipemia en la diabetes mellitus tipo 2. *Clin Invest Arterioscler* 2002;14:24-9.
4. Verges B. Antidiabétiques oraux et lipides. *Ann Endocrinol* 2002; 63:1S45-1S50.
5. Gotto AM. Lipid management in diabetic patients: lessons from prevention trials. *Am J Med* 2002;112:19S-26S.
6. Greenberg AS, Pittas AG. Thiazolidinediones in the treatment of type 2 diabetes. *Exp Opin Pharmacother* 2002;3:529-40.
7. Laguna JC. Mecanismo de acción de la rosiglitazona como activador del receptor PPAR γ . *Clin Invest Arterioscler* 2002;14:10-6.
8. Rosiglitazona (Avandia®). *Panorama Actual Med* 2001;25:283-6.
9. Lasunción MA. Efectos de la rosiglitazona sobre el metabolismo lipídico. *Clin Invest Arterioscler* 2002;14:30-42.
10. Bickel J-F. Rosiglitazone: les éléments cliniques. *Ann Endocrinol* 2002;63:1S27-1S33.
11. Freed MI, Ratner R, Marcovina SM, Kreider MM, Biswas N, Cohen BR, et al. Effects of rosiglitazone alone and in combination with atorvastatin on the metabolic abnormalities in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002;90:947-52.
12. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Med* 2002;8:1235-42.
13. De Villiers WJ, Smart EJ. Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J Leukoc Biol* 1999;66:740-6.
14. Babiker A, Andersson O, Lund E, Xiu RJ, Deeb S, Reshef A, et al. Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *J Biol Chem* 1997;272:26253-61.
15. Schmitz G, Kaminski WE, Orso E. ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:493-501.
16. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997;272:20982-5.
17. Graf GA, Matveev SV, Smart EJ. Class B scavenger receptors, caveolae and cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc Med* 1999; 9:221-5.
18. Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, et al. Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abcl1-deficient mice. *Nat Genet* 2000;24:192-6.
19. Bist A, Fielding PE, Fielding CJ. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10693-8.
20. Matveev S, Uittenbogaard A, Van Der Westhuyzen D, Smart EJ. Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester. *Eur J Biochem* 2001;268:5609-16.
21. Mills GL, Lane PA, Weech PK. The isolation and purification of plasma lipoproteins. En: Mills GL, Lane PA, Weech PK, editors. A guidebook to lipoprotein technique. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984; pp. 25-50.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
23. Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73: 3178-82.
24. Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:265-72.
25. McCrohon JA, Nakhla S, Jessup W, Stanley KK, Celermajer DS. Estrogen and progesterone reduce lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages: a sex-specific effect. *Circulation* 1999;100:2319-25.
26. Llaверías G, Jové M, Vázquez-Carrera M, Sánchez R, Díaz C, Hernández G, et al. Avasimibe and atorvastatin synergistically reduce cholesteryl ester content in THP-1 macrophages. *Eur J Pharmacol* 2002;451:11-7.
27. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR- γ dependent and independent effects on macrophage gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001;7:48-52.
28. Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, et al. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol* 2002;22:2607-19.
29. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65:55-63.
30. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 1990;343:531-5.
31. Platt N, Gordon S. Is the class A macrophage scavenger receptor (MSR-1) multifunctional? – The mouse's tale. *J Clin Invest* 2001; 108:649-54.
32. Matsumoto A, Naito M, Ikaura H, Ikemoto S, Asaoka H, Hayakawa I, et al. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9133-7.
33. Krieger M, Hertz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994;63:601-37.
34. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997;386:292-6.
35. Hrboticky N, Draude G, Hapfelmeier G, Lorenz R, Weber PC. Lovastatin decreases the receptor-mediated degradation of acetylated and oxidized LDLs in human blood monocytes during the early stage of differentiation into macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1267-75.
36. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, et al. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nature Med* 2001;7:41-7.
37. Vosper H, Patel L, Graham TL, Khouidoli GA, Hill A, Macphree CH, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem* 2001;276: 44258-65.
38. Sugano R, Yamamura T, Harada-Shiba M, Miyake Y, Yamamoto A. Uptake of oxidized low-density lipoprotein in a THP-1 cell line lacking scavenger receptor A. *Atherosclerosis* 2001;158:351-7.
39. Whitman SC, Rateri DL, Szilvassy SJ, Cornicelli JA, Daugherty A. Macrophage-specific expression of class A scavenger receptors in LDL receptor $-/-$ mice decreases atherosclerosis and changes spleen morphology. *J Lipid Res* 2002;43:1201-8.
40. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR- γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93:241-52.
41. Patel L, Charlton SJ, Marshall IC, Moore GB, Coxon P, Moores K, et al. PPAR γ is not a critical mediator of primary monocyte differentiation or foam cell formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:707-12.
42. Iida KT, Kawakami Y, Suzuki H, Sone H, Shimano H, Toyoshima H, et al. PPAR gamma ligands, troglitazone and pioglitazone, up-regulate expression of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase gene in THP-1 macrophages. *FEBS Lett* 2002;520:177-81.
43. Pietsch A, Erl W, Lorenz RL. Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocyte cell. *Biochem Pharmacol* 1996;52:433-9.
44. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 2001;7:161-71.
45. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, et al. PPAR- γ and PPAR- α activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001;7:53-58.
46. Claudel T, Leibowitz MD, Fievet C, Tailleux A, Wagner B, Repa JJ, et al. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2610-5.
47. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poullain P. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000;101:2411-7.
48. Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Quehenberger O. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem* 1997;272:17551-7.