

Ritonavir incrementa la expresión de CD36 y ABCA1 en macrófagos THP-1

Jordi Pou^a, Alba Rebollo^a, Juan Pedro-Botet^b y Marta Alegret^a

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

^bServicio de Medicina Interna. Hospital Universitario del Mar. Barcelona. España.

El ritonavir es uno de los inhibidores de las proteasas que se utilizan como parte del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) para la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, y su uso se ha asociado a un aumento en el riesgo de aterosclerosis prematura. Se ha propuesto que el ritonavir favorece la formación de células espumosas, aunque los estudios previos realizados han mostrado efectos contradictorios de este fármaco sobre las concentraciones del receptor *scavenger* CD36 en monocitos y macrófagos. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con ritonavir a concentraciones dentro del rango terapéutico produce un incremento en la expresión de proteína y ARNm de CD36 en macrófagos THP-1 diferenciados, pero no en monocitos de la misma línea celular. Estas diferencias se podrían deber a la activación de la proteincinasa C producida tras la diferenciación con el éster de forbol PMA y la consiguiente activación de proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ). Este mecanismo también explicaría el incremento en la expresión de ABCA1 hallado en nuestro estudio, aunque no la reducción

de las concentraciones de proteína SR-BI, que no parece ser un efecto de tipo transcripcional. Finalmente, la inducción de PPAR γ y CD36 causada por el ritonavir no se asocia a un incremento en las concentraciones de la forma madura de SREBP1.

Palabras clave:

VIH. Macrófago. Ritonavir. CD36. ABCA1. SR-BI.

RITONAVIR INCREASES CD36 AND ABCA1 EXPRESSION IN THP-1 MACROPHAGES

Ritonavir, a protease inhibitor used in highly active antiretroviral therapy (HAART) for HIV-1 infection, is associated with an increased risk of premature atherosclerosis. It has been proposed that ritonavir facilitates foam cell formation from macrophages, but conflicting results on the effect of this drug on CD36 scavenger receptor expression in monocytes and macrophages have been published. Our results show that ritonavir exposure at concentrations within the therapeutic range cause an increase in CD36 protein and mRNA levels in differentiated THP-1 macrophages, but not in monocytes from the same cell line. Protein kinase C (PKC) activation by the differentiating agent PMA and subsequent peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) activation could account for these differences. This mechanism could also explain the increase in ABCA1 expression found in our study, but not the decrease in SR-BI protein, which does not seem to be a transcriptional effect. Finally, PPAR γ and CD36 up-regulation by ritonavir are not related to an increase in levels of mature SREBP1.

Key words:

HIV. Macrophage. Ritonavir. CD36. ABCA1. SR-BI.

Este estudio ha sido financiado por una Beca de la Fundación Española de Arteriosclerosis/Sociedad Española de Arteriosclerosis (2005).

Una comunicación referente a esta línea de trabajo, titulada "Ritonavir: efectos sobre la expresión de proteínas implicadas en la homeostasis de colesterol en macrófagos", se presentó en el XX Congreso Nacional de la SEA (Valencia 2007) y galardonada con una mención especial.

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

Recibido el 9 de mayo de 2007 y aceptado el 16 de mayo de 2007.

El tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) consiste en la combinación de diversos fármacos antirretrovirales, por lo general un análogo nucleósido, un inhibidor de proteasas (IP) y un tercer fármaco que puede ser un segundo análogo de nucleósidos o un inhibidor de la transcriptasa inversa de tipo no nucleósido. Desde la introducción de este esquema terapéutico, se ha evidenciado en la población con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) un aumento de la supervivencia, una menor progresión de la enfermedad y un descenso de los ingresos hospitalarios y costes asociados^{1,2}.

Sin embargo, la dislipemia, la redistribución de la grasa corporal y la resistencia a la insulina, constituyen importantes problemas asociados a este tratamiento³. Aunque los diversos agentes farmacológicos que configuran el TARGA parecen tener distintos efectos sobre el perfil lipídico⁴, habitualmente hay una elevación de las concentraciones de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) y de triglicéridos, y una reducción del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL), junto con resistencia a la insulina⁵. Estas anomalías se atribuyen principalmente al uso de IP; en particular, la utilización de ritonavir se asocia a un riesgo de hipercolesterolemia mayor que otros IP, como nelfinavir e indinavir⁵. Cabe destacar que gran parte de los efectos asociados al uso de TARGA coinciden con las características del síndrome metabólico⁶.

Poco después de la introducción del TARGA se describieron los primeros indicios de que los pacientes con infección por el VIH en tratamiento presentaban un notable incremento del riesgo cardiovascular, hecho confirmado recientemente en 2 amplios estudios prospectivos^{7,8}. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que se produce aterosclerosis precoz en los pacientes con infección por el VIH y en qué grado la utilización del TARGA contribuye al establecimiento de la aterosclerosis se desconocen todavía.

Entre los mecanismos que conducen a la formación de lesiones ateroscleróticas, uno de los fenómenos iniciales es la acumulación de lípidos en el interior de los macrófagos, lo que genera las células espumosas. Dicho acúmulo se produce como consecuencia de un desequilibrio entre los procesos que aportan colesterol a la célula y los mecanismos que promueven su eliminación. En el primer caso, la entrada masiva de lípidos en el macrófago de forma no regulada por las concentraciones intracelulares de colesterol se produce como resultado de la internalización de LDL modificadas a través de los receptores *scavenger*, principalmente el receptor de

clase B CD36⁹. En lo referente al proceso de eliminación de colesterol, éste está mediado principalmente por el transportador ABCA1, que facilita el eflujo de colesterol y fosfolípidos hacia la apolipoproteína A-I¹⁰ y por el receptor *scavenger* de tipo B clase I (SR-BI) o su homólogo humano CLA-1, que promueve el eflujo de colesterol hacia las HDL¹¹.

Algunos estudios recientes han intentado elucidar el mecanismo por el cual los IP promueven el desarrollo de la aterosclerosis, centrándose en el monocito/macrófago como célula clave en este proceso y en la expresión de CD36¹²⁻¹⁴. En el primero de estos estudios¹², se analizó el efecto de un tratamiento con fármacos antirretrovirales durante 7 días sobre las concentraciones de CD36 en monocitos de voluntarios sanos y de pacientes infectados por el VIH. Se demostró una reducción significativa de las concentraciones de CD36 en el 70% de los participantes. En contraposición, los resultados de los otros estudios^{13,14} indican que diversos IP inducen la expresión de CD36 y la acumulación de ésteres de colesterol en monocitos/macrófagos humanos *in vitro*¹³. En cuanto al mecanismo por el que los IP inducen la expresión de CD36, éste podría estar relacionado con la activación del receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ) y con la acumulación de la forma madura de *sterol reponse element binding proteins* (SREBP)¹³.

Resulta evidente que las alteraciones en la expresión de CD36 pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis mediada por el TARGA. Sin embargo, hay notables discrepancias entre los estudios publicados, que pueden atribuirse a diferencias en el diseño experimental, en parte relacionadas con la concentración de fármaco o con el tipo y/o estado de diferenciación de las células estudiadas (monocitos o macrófagos). Por otro lado, no se dispone de información acerca de posibles modificaciones en la expresión de otros genes tan importantes como *CD36* en el proceso de acumulación de lípidos en monocitos y macrófagos, concretamente *SR-BI* y *ABCA1*. Las modificaciones en la expresión de estos genes podrían contribuir o contrarrestar, según que el efecto fuera de represión o de inducción, la acumulación de colesterol en dichas células. El presente trabajo se ha diseñado con la finalidad de aportar respuestas a estos interrogantes.

Material y método

El ritonavir utilizado en este estudio fue proporcionado por Abbot Laboratories (Chicago, EE.UU.). Los reactivos usados para el cultivo celular proceden de Gibco, Invitrogen (Paisley, Reino Unido). El suero bovino fetal, el 4-beta forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich

(St. Louis, MO, EE.UU.). El reactivo Trizol utilizado para la obtención del ARN total y los reactivos usados para la reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) son 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 -[32 P]dATP, de Amersham Biosciences (Freiburg, Alemania). Los anticuerpos contra ABCA1 y SR-BI son de Novus Biologicals, contra SREBP-1 de Santa Cruz, y el anticuerpo anti- β -actina se obtuvo de Sigma-Aldrich. El resto de reactivos utilizados son de grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales.

Cultivo celular

La línea 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 tampón Hepes, suplementado con un 10% de suero bovino fetal, un 1% de L-glutamina 200 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin a 37 °C en un 5% de CO₂.

Las células se utilizaron sin diferenciar (monocitos) o tras la diferenciación con PMA durante 24 h. Después de 3 lavados, se incubaron las células durante otras 24 h con ritonavir (0,05-2,5 μ g/ml) disuelto en etanol (concentración final de etanol en el medio de cultivo: 0,1%). La viabilidad celular se determinó por el método MTT¹⁵.

Expresión de CD36 en superficie

El análisis de la expresión de CD36 en la superficie celular se realizó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo contra CD36 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), de Serotec. Las células se cultivaron y trataron como se ha indicado, y al finalizar el tratamiento se lavaron las placas y se incubaron con PBS que contenía un 0,5% de BSA y EDTA 2 mM. La suspensión celular se centrifugó (10 min, 1.000 g, 4 °C), y el pellet se resuspendió y se incubó con el anticuerpo conjugado con FITC durante 30 min a 4 °C en la oscuridad. Tras un lavado con PBS frío, la fluorescencia se analizó con un citómetro de flujo (Epics XL).

Preparación y análisis del ARN

El ARN total se aisló mediante el reactivo Trizol, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las concentraciones relativas de ARN mensajero (ARNm) se determinaron mediante la reacción de la RT-PCR. El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 0,5 μ g de ARN total mediante su incubación con 125 ng de *random hexamers* en presencia 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de ditiotretol, 200 U de la enzima M-MLV-transcriptasa inversa, 20 U ARNsin y 0,5 mM de cada dNTP en un volumen total de 20 μ l de tampón Tris/HCl, 50 mM, pH 8,3. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 1 h. Una alícuota de 5 μ l de la reacción de RT se utilizó para la reacción de amplificación de PCR junto con los oligonucleótidos específicos. Así, cada 50 μ l de la reacción de PCR contenían 5 μ l de la reacción de RT, 1,2 mM MgCl₂, 200 M dNTP, 0,25 μ Ci α -[32 P]dATP (3.000 Ci/mmol), 1 U de TaqADN polimerasa, 0,5 μ g de cada oligonucleótido específico (sentido y antisentido) en tampón Tris/HCl, 20 mM, pH 8,5. Para evitar posibles hibridaciones inespecíficas, el ADNc y la Taq polimerasa se separaron de los oligonucleótidos específicos y de los dNTP mediante una capa de parafina; de este modo, sólo entran en contacto cuando la parafina funde a 60 °C. Las secuencias de los oligonucleótidos sentido y antisentido utilizadas para estudiar cada uno de los genes fueron CD36, 5'-CTGTGACCGAACTGTGGGCT-3' y 5'-GAA

GATGGCACCATTGGGCTG-3'; ABCA1, 5'-GGAGGCAATGGCACTGAGGAA-3' y 5'-CCTGCCTTGTGGCTGGAGTGT-3'; SR-BI: 5'-ACGACACCGTGTCTTCCTCG-3' y 5'-CGGGCTGTAGAATC-CAGCGA-3'; PPAR γ , 5'-CAITCTGGCCCCACCAACTTTGG-3' y 5'-TGGAGATGCAGGCTCCACTTTG-3'; y *gapdh*, 5'-CAGTCCATGC-CATCACTGCCA-3' y 5'-AGGTGGAGGAGTGGGTGTGCG-3'. La PCR se realizó en un termociclador MJ Research equipado con un sistema Peltier y una sonda de temperatura. Después de una desnaturalización de 1 min a 94 °C, la PCR se llevó a cabo en 20 (PPAR γ), 19 (SR-BI) y 18 (CD36, ABCA1) ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió 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 50 s. La reacción se terminó, al final del último ciclo de amplificación, con 5 min de síntesis final a 72 °C. Un total de 5 μ l de la PCR se sometieron a electroforesis en gel de poliácridamida al 5% y los productos de amplificación se visualizaron mediante autoradiografía (Agfa, Medical X-ray film). La amplificación de cada gen dio lugar a la visualización de una sola banda del tamaño esperado (PPAR γ , 229 bp; ABCA1, 181 bp; CD36, 361 bp; SR-BI, 509 bp, y *gapdh*, 302 bp). Para cada uno de los genes estudiados se realizaron ensayos 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). Finalmente, la intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría (Vilbert Lourmat Imaging). Este método permite la cuantificación relativa de las concentraciones de ARNm de cada uno de los genes estudiados, normalizados utilizando la *gapdh* como control interno.

Análisis de Western blot

Se sometieron 40 μ g de extracto de proteína total a electroforesis en geles de SDS-poliácridamida (12,5%). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P de Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en tampón TBS que contenía un 5% de leche en polvo no grasa, y la inmunodetección se realizó utilizando anticuerpos policlonales de conejo contra SR-BI o ABCA1 (dilución 1:500 en solución de bloqueo, durante 1,5 h en el caso de SR-BI o durante toda la noche en el caso de ABCA1). Dichas membranas se lavaron 3 veces durante 5 min (más un lavado adicional de 15 min en el caso de ABCA1), antes de proceder a su incubación con un anticuerpo secundario adecuado (dilución 1:2.000), durante 2 h. Las membranas también se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti- β -actina (dilución 1:5.000), para comprobar que la carga de proteína entre las distintas muestras era equivalente. El tamaño de las proteínas detectadas se estimó utilizando estándares de peso molecular (BioRad). La inmunodetección se llevó a cabo por quimioluminiscencia utilizando el *enhanced chemiluminescence* (ECL) *detection system* (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La quimioluminiscencia se detectó mediante un detector Chemidoc XRS (BioRad) y el análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa informático Quantity One®. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias en relación con el control, una vez normalizados respecto al β -actina.

Obtención de extractos nucleares y determinación de SREBP1

Macrófagos THP-1 diferenciados durante 24 h se incubaron con ritonavir (2,5 μ g/ml) durante 6 y 24 h. A partir de dichos

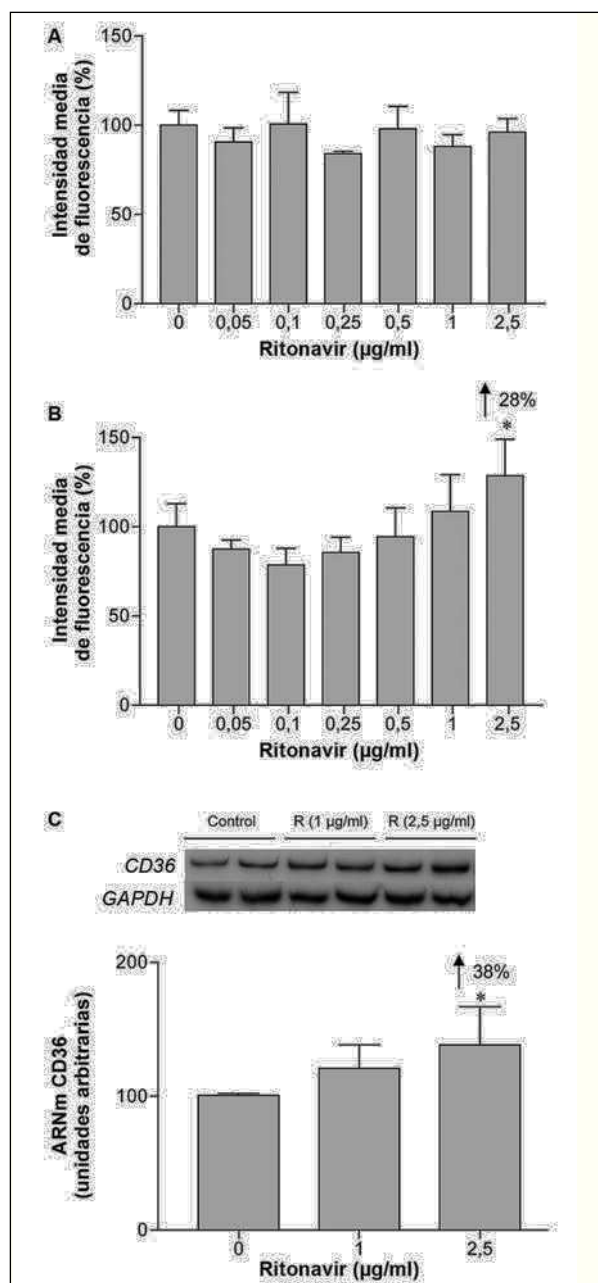


Figura 1. El ritonavir incrementa la expresión de CD36 en macrófagos pero no en monocitos THP-1. A) Análisis de la expresión en la superficie celular de CD36 en monocitos THP-1 incubados con distintas concentraciones (0,05-2,5 µg/ml) de ritonavir durante 24 h. B) Análisis de la expresión en la superficie celular de CD36 en macrófagos THP-1 incubados con distintas concentraciones (0,05-2,5 µg/ml) de ritonavir durante 24 h. C) Análisis de las concentraciones de ARNm de CD36 en macrófagos THP-1 expuestos a ritonavir (0,05-2,5 µg/ml) durante 24 h. Se muestran autorradiografías representativas y las cuantificaciones correspondientes a las concentraciones de ARNm normalizados por el gen control *gapdh*. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar de 3-4 experimentos independientes realizados por duplicado. *p < 0,05 respecto las correspondientes células control.

macrófagos se prepararon extractos nucleares utilizando triton al 0,03% para lisar las células. Tras la cuantificación de la concentración proteica, 30 µg de los extractos nucleares se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (10%). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P), que se incubaron con un anticuerpo policlonal contra la SREBP-1 humana (dilución 1:200) durante toda la noche a 4 °C. Después de diversos lavados, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario adecuado durante 1 h. La igualdad de carga de proteína en cada carril se verificó por incubación con un anticuerpo monoclonal contra la β -actina (dilución 1:500). La inmunodetección se llevó a cabo por quimioluminiscencia mediante el Chemidoc XRS (BioRad) y el programa Quantity One®.

Análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden a la media \pm desviación estándar de un mínimo de 3 experimentos realizados por duplicado. La significación estadística de las diferencias se evaluó mediante el test ANOVA combinado con el test de la t de Student-Newman-Keuls, utilizando el programa informático GraphPad Instat.

Resultados

Ritonavir modifica la expresión de CD36 según el estado de diferenciación celular

Debido a los resultados contradictorios obtenidos en estudios previos, y que podían deberse a diferencias en el tipo de célula o en el grado de maduración del monocito-macrófago, se evaluó el efecto del ritonavir en una misma línea celular monocítica (THP-1) sin diferenciar o tras la diferenciación por exposición a PMA durante 24 h. Teniendo en cuenta que en los estudios existentes la concentración de ritonavir utilizada era muy distinta (desde 0,03 hasta 10 µg/ml), las células se trataron con concentraciones crecientes de ritonavir y se evaluó la posible citotoxicidad por la técnica de MTT. Los resultados muestran que la utilización de concentraciones de ritonavir > 2,5 µg/ml produce efectos citotóxicos inaceptables, por lo que se decidió trabajar en el rango de 0,05 a 2,5 µg/ml. Como se muestra en la figura 1A, las concentraciones de proteína CD36 en la superficie celular no resultan modificadas de forma significativa en monocitos no diferenciados. En cambio, en macrófagos diferenciados con PMA durante 24 h, el tratamiento con ritonavir aumenta la expresión de CD36 en la superficie celular (el 28% de inducción a la concentración de 2,5 µg/ml; p < 0,05) (fig. 1B).

Ritonavir afecta la expresión de proteínas relacionadas con el flujo de colesterol

En función de los resultados obtenidos, se decidió continuar el estudio con células diferenciadas durante 24 h, evaluando el posible efecto de ritona-

vir sobre 2 proteínas implicadas en el eflujo de colesterol, ABCA1 y SR-BI. La figura 2A muestra que el tratamiento con ritonavir incrementa las concentraciones de proteína de ABCA1 a las concentraciones más altas, y el efecto máximo (el 83% de incremento; $p < 0,05$) se observa a 1 $\mu\text{g/ml}$. Por el contrario, las concentraciones de proteína de SR-BI disminuyen un 46% a la concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$) (fig. 3A).

Efecto del ritonavir sobre los valores de ARNm de CD36, ABCA1 y SRBI

Con el objetivo de comprobar si las modificaciones en las concentraciones de proteína se producían a través de un mecanismo transcripcional, se trataron los macrófagos THP-1 con 1 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de ritonavir, y se determinaron las concentraciones de ARNm de CD36, SR-BI y ABCA1 por la técnica de RT-PCR. El tratamiento con ritonavir a la concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ produce un aumento del 38% en las concentraciones de ARNm de CD36 ($p < 0,05$) (fig. 1C). También se incrementa de forma significativa el ARNm de ABCA1 a las 2 concentraciones ensayadas (el 32 y el 49%, respectivamente; $p < 0,05$) (fig. 2B), mientras que no se observan reducciones significativas en la expresión del ARNm de SR-BI (fig. 2C).

La expresión de PPAR γ se incrementa en macrófagos tratados con ritonavir

Para profundizar en el mecanismo a través del cual el ritonavir modifica la expresión de CD36, se determinó la expresión del ARNm de PPAR γ tras el tratamiento con ritonavir a las mismas concentraciones. Como se puede observar en la figura 4, las concentraciones de ARNm de PPAR γ se incrementan un 51% a la concentración máxima de ritonavir utilizada ($p < 0,05$).

Efecto de ritonavir en las concentraciones de SREBP-1 en macrófagos

Debido a la existencia de estudios previos en los que se sugiere que los inhibidores de proteasas pueden modular las concentraciones de CD36 y PPAR γ por un efecto mediado por SREBP, se determinó el efecto de ritonavir, a la concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, en el valor de la forma madura, transcripcionalmente activa de SREBP-1 en extractos nucleares. En la figura 5 se muestra que el tratamiento con ritonavir durante 6 h produce una reducción transitoria en la expresión de la forma madura de SREBP-1 (el 50%; $p < 0,05$), pero que las concentraciones de esta proteína retornan a los valores control en tratamientos de 24 h.

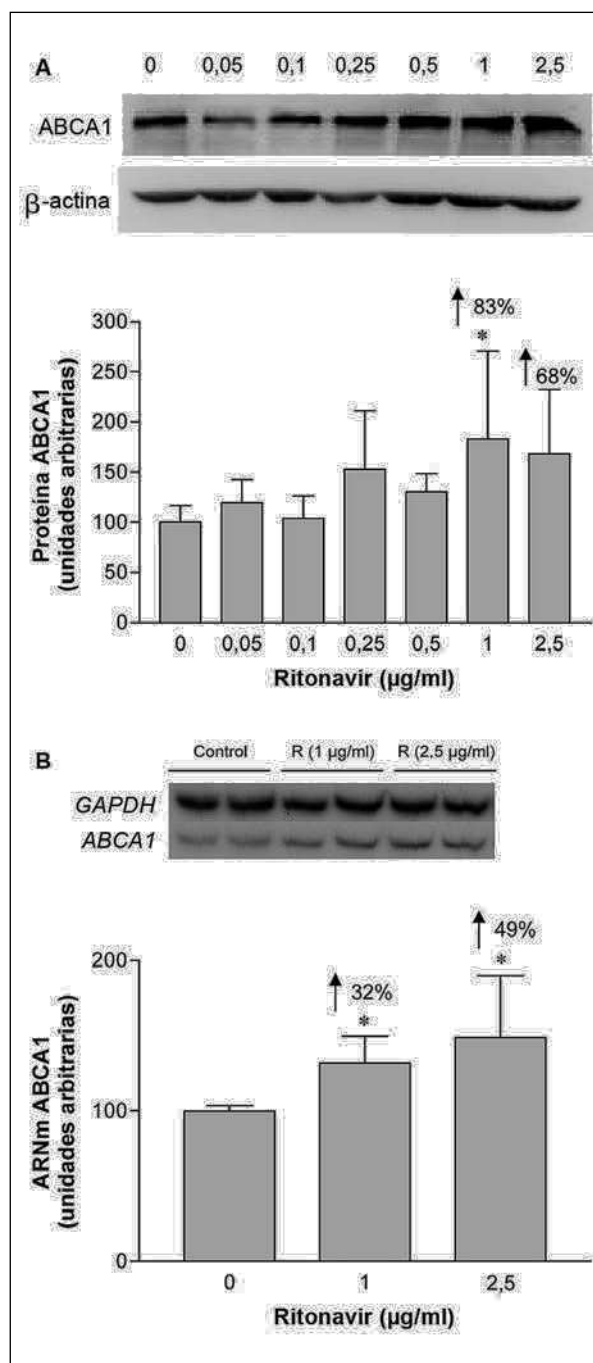


Figura 2. El ritonavir induce la expresión de ABCA1 en macrófagos THP-1. A) Se trataron macrófagos THP-1 con varias concentraciones (0,05–2,5 $\mu\text{g/ml}$) de ritonavir durante 24 h. Las concentraciones de proteína ABCA1 se determinaron según se indica en “Material y método”. B) Se incubaron macrófagos THP-1 con ritonavir 1 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h. Las concentraciones de ARNm correspondientes a ABCA1 se determinaron por RT-PCR según se indica en “Material y método”. Se muestran autorradiografías representativas y las cuantificaciones correspondientes. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar de 3–6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ respecto a las correspondientes células control.

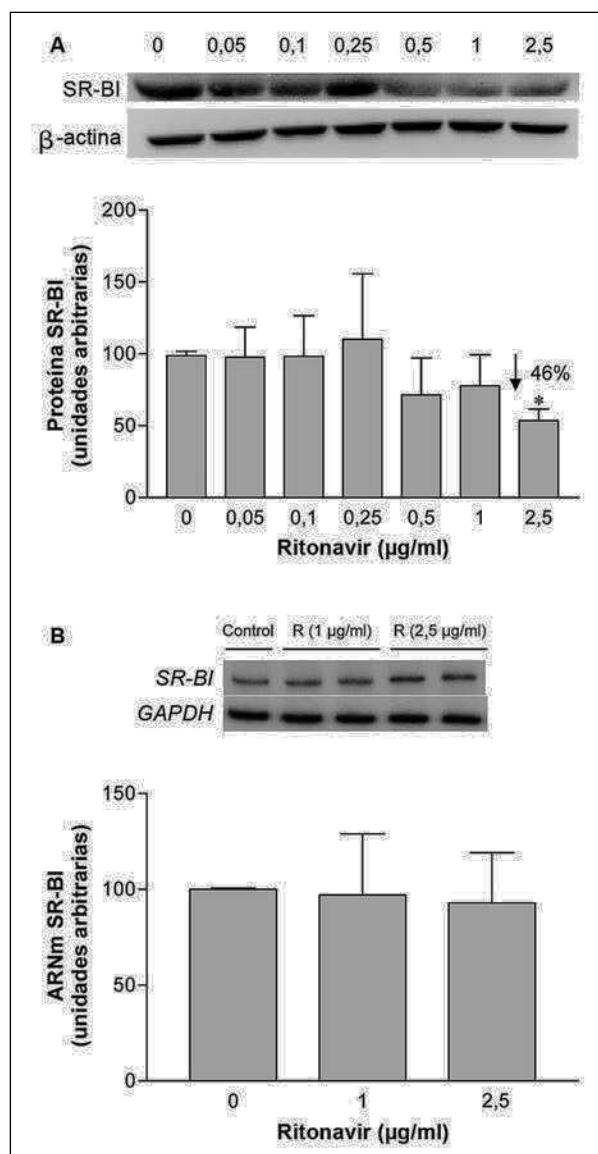


Figura 3. El ritonavir reduce las concentraciones de proteína SR-BI pero no modifica la expresión del ARNm en macrófagos THP-1. A) Se trataron macrófagos THP-1 con varias concentraciones (0,05-2,5 μg/ml) de ritonavir durante 24 h. Las concentraciones de proteína SR-BI se determinaron según se indica en "Material y método". B) Se incubaron macrófagos THP-1 con ritonavir 1 y 2,5 μg/ml durante 24 h. Las concentraciones de ARNm correspondientes a SR-BI se determinaron por RT-PCR tal y como se indica en "Material y método". Se muestran autorradiografías representativas y las cuantificaciones correspondientes. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar de 3-5 experimentos independientes. * $p < 0,05$ respecto a las correspondientes células control.

Discusión

En el presente estudio se han determinado los efectos del ritonavir sobre la expresión de proteínas que controlan las concentraciones intracelulares de

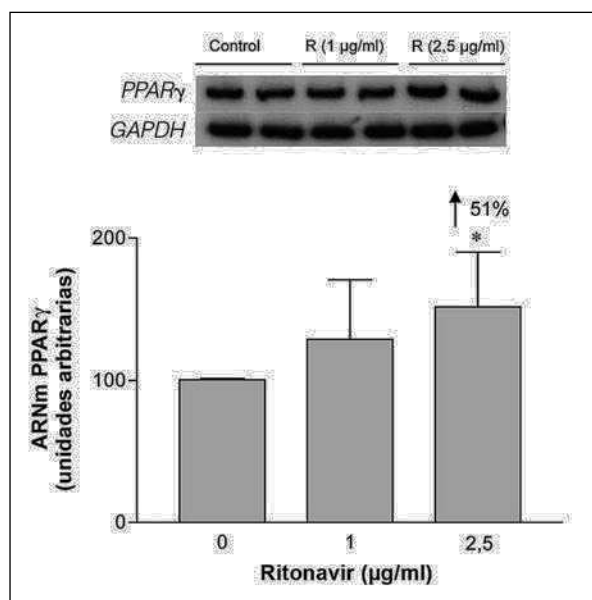


Figura 4. El tratamiento con ritonavir induce la expresión de PPARγ en macrófagos THP-1. Análisis de las concentraciones de ARNm de PPARγ en células THP-1 tratadas con ritonavir (1 y 2,5 μg/ml) durante 24 h. Se analizaron 0,5 μg de ARN total por RT-PCR como se describe en "Material y método". Se muestran autorradiografías representativas y las cuantificaciones correspondientes a las concentraciones de ARNm normalizadas por el gen control *gapdh*. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar de 6 experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$ respecto a las correspondientes células control.

colesterol en un modelo de monocito-macrófago, la línea celular THP-1. Las concentraciones de ritonavir utilizadas se hallan dentro del rango que se alcanza en el plasma de pacientes tratados con dicho fármaco a la dosis recomendada (600 mg de ritonavir/12 h), que puede llegar a un máximo de aproximadamente 11 μg/ml¹⁴. Algunos autores utilizan concentraciones de ritonavir muy elevadas (hasta 20 μg/ml) en células THP-1¹⁴, pero según nuestra experiencia, concentraciones > 2,5 μg/ml resultan citotóxicamente inaceptables. De hecho, estudios realizados en células endoteliales muestran que el ritonavir, a la concentración de 11 μg/ml, produce una reducción significativa de la viabilidad celular¹⁶. Por otra parte, el tratamiento de macrófagos J774 con ritonavir produce un incremento significativo del número de células apoptóticas, que ya se aprecia a la concentración de 3,6 μg/ml¹⁷.

Diversos estudios han establecido que el ritonavir puede modificar la expresión de CD36 en monocitos y macrófagos, aunque algunos indicaban una reducción¹² y otros un incremento^{13,14} en las concentraciones de este receptor. Las discrepancias

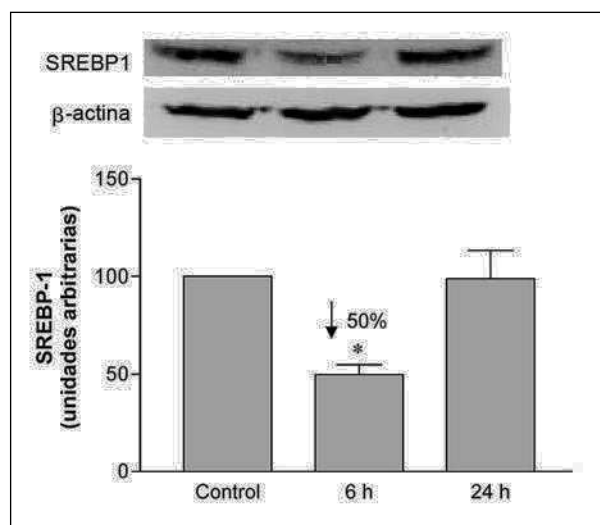


Figura 5. Efecto del ritonavir sobre las concentraciones de la forma madura de SREBP-1. Análisis de las concentraciones de proteína SREBP1 en extractos nucleares obtenidos a partir de macrófagos THP-1 control y tratados con 2,5 μ g/ml de ritonavir durante 6 y 24 h. Se muestran autorradiografías representativas y las cuantificaciones correspondientes a las concentraciones de proteína normalizadas por la β -actina. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$ respecto a las correspondientes células control.

en los resultados obtenidos llevaron a hipotetizar que el ritonavir produce efectos distintos según el estado de diferenciación de la célula¹⁸. Sin embargo, resulta difícil comparar estudios realizados en distintas condiciones experimentales o con células de distintas procedencias, por lo que, en primer lugar, nos propusimos evaluar el efecto de ritonavir sobre la misma línea celular (THP-1) con la utilización de monocitos no diferenciados o tras su diferenciación con PMA. Los resultados mostraron que ritonavir no ejercía un efecto significativo en monocitos, mientras que en macrófagos diferenciados con PMA durante 24 h la expresión de CD36 en la superficie celular se incrementaba de forma significativa a la concentración más alta de ritonavir (fig. 1B), al igual que las concentraciones de ARNm correspondientes (fig. 1C). Allred et al¹⁹ demostraron que la ausencia del receptor estrogénico α (ER α) favorece el incremento en la expresión de CD36 en los macrófagos de ratones tratados con ritonavir. Sin embargo, este mecanismo no parece explicar los distintos resultados hallados en monocitos y macrófagos, pues las células THP-1 no estimuladas no expresan ER α y sí lo expresan tras su diferenciación con ésteres de forbol²⁰, por lo que los monocitos deberían ser más sensibles al ritonavir. Por

otra parte, es bien conocido que los ésteres de forbol activan la proteincinasa C (PKC) y se ha propuesto que el incremento que el ritonavir produce sobre la expresión de CD36 está mediado por la activación de PKC. Es posible, pues, que la activación de la PKC producida por el PMA sea la causa, al menos en parte, de la mayor sensibilidad al ritonavir respecto a la inducción de CD36 que se observa tras la diferenciación por este agente.

Otro de los mecanismos propuestos para explicar los efectos de los inhibidores de proteasas sobre la expresión de CD36 involucra cambios en la expresión o actividad de PPAR γ . Así, según Serghides et al¹², la reducción en la expresión de CD36 en monocitos podría deberse a un déficit en la señalización o activación del heterodímero PPAR γ -RXR. Por el contrario, Dressman et al¹³, en células mononucleares humanas tratadas con ritonavir en combinación con LDL agregadas, observaron un incremento del ARNm CD36 mediado por un incremento de PPAR γ producido vía PKC.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con ritonavir produce modificaciones en la expresión del ARNm de PPAR γ que son paralelas a las producidas sobre el ARNm y la proteína de CD36. Por tanto, resulta plausible que el incremento de la expresión de CD36 causado por el ritonavir esté mediado por la inducción de PPAR γ que se produce a las dosis más altas utilizadas. La inducción de PPAR γ explicaría también el incremento observado en el ARNm y la proteína correspondientes a ABCA1, ya que en macrófagos humanos los agonistas PPAR γ incrementan la expresión de ABCA1²¹.

Se ha propuesto que el incremento de PPAR γ y CD36 producido en macrófagos por acción del ritonavir se debe a la inhibición del proteasoma por parte de este fármaco, lo que conduciría a una menor degradación de SREBP y, por tanto, a un incremento de la forma madura de estos factores de transcripción en macrófagos¹⁸. En este mismo sentido, Zhou et al¹⁷ observaron que el tratamiento de macrófagos J774 con diversos inhibidores de proteasas incrementa de forma significativa las concentraciones de las formas maduras, transcripcionalmente activas, de SREBP-1 y 2. Según nuestros resultados, el tratamiento con ritonavir no produce un incremento en la forma madura de SREBP-1 en extractos nucleares; al contrario, se observa una reducción transitoria en tratamientos cortos (6 h), que retorna a la expresión normal a las 24 h. Por lo tanto, no parece factible que el incremento de CD36 y PPAR γ en nuestro modelo celular se deba a una inhibición del proteasoma; de hecho, la inhibición del proteasoma parece requerir concentraciones muy elevadas de ri-

tonavir, del orden de 50-100 μM ¹⁷, muy por encima de las utilizadas en nuestro estudio.

Además del incremento en la expresión de CD36 y ABCA1, el tratamiento con ritonavir produce una notable reducción en las concentraciones de proteína de SR-BI, efecto que no se había descrito anteriormente por otros autores. El mecanismo no parece estar relacionado con la activación de PPAR γ , ya que los agonistas PPAR γ producen un incremento en la expresión de SR-BI^{22,23}. Además, en este caso, la reducción en las concentraciones de proteína no se acompaña de una inhibición de la expresión del ARNm correspondiente, lo que descartaría un mecanismo de tipo transcripcional.

El presente estudio se ha realizado en monocitos y macrófagos no expuestos a condiciones proaterogénicas, es decir, que no se han tratado con LDL modificadas. En estas condiciones los cambios producidos por el ritonavir en la expresión de CD36, ABCA1 y SR-BI no son suficientemente intensos para modificar de forma significativa la acumulación de colesterol, por lo que no se han determinado las concentraciones de esteroides intracelulares. Sin embargo, la utilización de ritonavir como parte del TARGA se asocia a dislipemia³, por lo que los monocitos circulantes de estos pacientes se hallan en un entorno proaterogénico. En estas condiciones, el incremento en la expresión de CD36 podría comportar una mayor captación de LDL modificadas, y la reducción de SR-BI una menor salida de colesterol hacia aceptores extracelulares como las HDL, lo que podría traducirse en la acumulación de colesterol en el macrófago y conducir a la formación de células espumosas. Sin embargo, el incremento en la expresión de ABCA1 podría dar lugar a una mayor salida de colesterol hacia apolipoproteínas aceptoras que compensara la mayor captación mediada por el aumento de CD36. Este efecto podría favorecerse por la reducción de SR-BI, ya que se ha propuesto que éste inhibe el flujo de colesterol mediado por ABCA1 en macrófagos²⁴.

En conclusión, nuestro estudio demuestra que en macrófagos THP-1 el tratamiento con ritonavir produce un incremento en la expresión de CD36 y ABCA1 posiblemente mediado por el aumento en la expresión de PPAR γ , y concomitantemente una reducción en la proteína SR-BI. Sin embargo, son necesarios más estudios, especialmente en células expuestas a condiciones proaterogénicas, para poder comprobar estos efectos y descifrar los mecanismos por los cuales el ritonavir puede inducir la formación de células espumosas y el desarrollo de aterosclerosis.

Agradecimientos

Agradecemos a Abbot la donación de ritonavir para realizar los estudios. Jordi Pou y Alba Rebollo son becarios de la Universidad de Barcelona y del FIS, respectivamente.

Bibliografía

- Manuel O, Thiebaut R, Darioli R, Tarr PE. Treatment of dyslipidaemia in HIV-infected persons. *Expert Opin Pharmacother*. 2005;6:1619-45.
- Sterne JA, Hernan MA, Ledergerber B, Tilling K, Weber R, Sendi P, et al. Long-term effectiveness of potent antiretroviral therapy in preventing AIDS and death: a prospective cohort study. *Lancet*. 2005;366:378-84.
- Carr A, Samaras K, Chisholm DJ, Cooper DA. Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet*. 1998;351:1881-3.
- Fontas E, Van LF, Sabin CA, Friis-Moller N, Rickenbach M, d'Arminio MA, et al. Lipid profiles in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: are different antiretroviral drugs associated with different lipid profiles? *J Infect Dis*. 2004;189:1056-74.
- Periard D, Telenti A, Sudre P, Cheseaux JJ, Halfon P, Reymond MJ, et al. Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. The Swiss HIV Cohort Study. *Circulation*. 1999;100:700-5.
- Jericó C, Knobel H, Montero M, Ordóñez-Llanos J, Guelar A, Gimeno JL, et al. Metabolic syndrome among HIV-infected patients: prevalence, characteristics, and related factors. *Diabetes Care*. 2005;28:132-7.
- Mary-Krause M, Cotte L, Simon A, Partisani M, Costagliola D. Increased risk of myocardial infarction with duration of protease inhibitor therapy in HIV-infected men. *AIDS*. 2003;17:2479-86.
- Friis-Moller N, Weber R, Reiss P, Thiebaut R, Kirk O, d'Arminio MA, et al. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients—association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *AIDS*. 2003;17:1179-93.
- Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*. 2002;277:49982-8.
- Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest*. 1999;104:R25-31.
- 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.
- Serghides L, Nathoo S, Walmsley S, Kain KC. CD36 deficiency induced by antiretroviral therapy. *AIDS*. 2002;16:353-8.
- Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Greenberg RN, Guerin T, et al. HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Clin Invest*. 2003;111:389-97.
- Munteanu A, Zingg JM, Ricciarelli R, Azzi A. CD36 overexpression in ritonavir-treated THP-1 cells is reversed by alpha-tocopherol. *Free Radic Biol Med*. 2005;38:1047-56.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
- Zhong DS, Lu XH, Conklin BS, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, et al. HIV protease inhibitor ritonavir induces cytotoxicity of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1560-6.
- Zhou H, Pandak WM Jr, Lyall V, Natarajan R, Hylemon PB. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response in macrophages: implication for atherosclerosis and cardiovascular disease. *Mol Pharmacol*. 2005;68:690-700.
- Hui DY. HIV protease inhibitors and atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2003;111:317-8.

19. Allred KF, Smart EJ, Wilson ME. Estrogen receptor-alpha mediates gender differences in atherosclerosis induced by HIV protease inhibitors. *J Biol Chem.* 2006;281:1419-25.
20. Cutolo M, Carruba G, Villaggio B, Coviello DA, Dayer JM, Campisi I, et al. Phorbol diester 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) up-regulates the expression of estrogen receptors in human THP-1 leukemia cells. *J Cell Biochem.* 2001;83:390-400.
21. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med.* 2001;7:53-8.
22. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, et al. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation.* 2000;101:2411-7.
23. Llaverias G, Rebollo A, Pou J, Vázquez-Carrera M, Sánchez RM, Laguna JC, et al. Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:605-14.
24. Chen W, Silver DL, Smith JD, Tall AR. Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1-mediated cholesterol efflux in macrophages. *J Biol Chem.* 2000;275:30794-800.