

# Efecto de la atorvastatina sobre la expresión vascular de los PPAR en conejos dislipémicos

María Miana<sup>a</sup>, David Sanz-Rosa<sup>a</sup>, Natalia de las Heras<sup>a</sup>, Paloma Aragoncillo<sup>b</sup>, Beatriz Martín<sup>a</sup>, Sandra Ballesteros<sup>a</sup>, Vicente Lahera<sup>a</sup> y Victoria Cachofeiro<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.

<sup>b</sup>Departamento de Patología. Unidad II. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. España.

**Introducción.** La familia de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) presenta efectos antiinflamatorios, antioxidantes así como efectos sobre el metabolismo lipídico y glucídico. Las estatinas presentan ciertos efectos parecidos a los PPAR, por lo que se ha sugerido que parte de sus acciones podrían estar mediadas por los PPAR.

**Objetivo.** Evaluar el efecto de la dislipemia y del tratamiento con atorvastatina sobre la expresión vascular de los PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$ , la función endotelial y la lesión aterosclerótica.

**Material y método.** Se utilizaron conejos macho New Zealand alimentados con una dieta con un 1% de colesterol con o sin tratamiento con atorvastatina (1 mg/kg/día) durante 10 semanas. Un grupo de animales alimentados con una dieta estándar se utilizó como un grupo control. Se evaluó la respuesta a la acetilcolina ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/l) y al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/l) en la aorta. Se realizó el análisis morfométrico de la aorta, así como la expresión vascular de los PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$  por RT-PCR a tiempo real.

**Resultados.** Los animales alimentados con una dieta con un 1% de colesterol presentaron concentraciones de colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) y triglicéridos superiores a los de los conejos

controles. La dislipemia se asoció con un engrosamiento de la íntima, una reducción de la relajación a la acetilcolina y una reducción de la expresión vascular de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ . El tratamiento con atorvastatina normalizó las concentraciones de triglicéridos y redujo las de colesterol total y cLDL, aunque no fue capaz de normalizarlas. Asimismo, redujo el tamaño de la lesión aterosclerótica, y previno la reducción de la relajación a la acetilcolina y de la expresión de los PPAR. Ni la dislipemia ni el tratamiento con atorvastatina fueron capaces de modificar la expresión de los PPAR $\beta/\delta$ .

**Conclusiones.** Estos datos sugieren que la dislipemia tiene un efecto diferencial sobre la expresión aórtica de los distintos PPAR, ya que reduce los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  y no altera los PPAR $\beta/\delta$ . El aumento de la expresión de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  observado con el tratamiento con atorvastatina podría participar en los efectos antiaterogénicos ejercidos por ella.

**Palabras clave:**

Aterosclerosis. Disfunción endotelial. Dislipemia. Estatinas. PPAR.

## EFFECT OF ATORVASTATIN ON VASCULAR EXPRESSION OF PPAR IN DYSLIPIDEMIC RABBITS

**Introduction.** The family of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) displays anti-inflammatory and anti-oxidant effects, as well as some effects that act on lipid and glucose metabolism. Statins show certain effects similar to those of PPARs, and consequently it has been suggested that these drugs could exert their anti-atherogenic effects by means of PPAR modulation.

Este trabajo ha sido posible gracias a una beca de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (FEA/SEA: Pfizer 2005).

Correspondencia: Dra. V. Cachofeiro.  
Departamento de Fisiología.  
Facultad de Medicina. Universidad Complutense.  
28040 Madrid. España.  
Correo electrónico: vcara@med.ucm.es

Recibido el 4 de abril de 2007 y aceptado el 7 de mayo de 2007.

**Aim.** To evaluate the effect of dyslipidemia and atorvastatin treatment on vascular expression of PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$ , endothelial function, and atherosclerotic lesions.

**Material and method.** Male New Zealand rabbits were fed a 1% cholesterol-enriched diet with or without atorvastatin (1 mg/kg/day) for 10 weeks. A group of animals fed a standard diet was used as a control. At the end of the treatment, responses to acetylcholine ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/l) and sodium nitroprusside were evaluated ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/l). Morphometric analysis of the aorta was performed, as well as real time RT-PCT to measure vascular expression of PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$ .

**Results.** Animals fed a cholesterol-enriched diet had higher levels of total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol and triglycerides than controls. Dyslipidemia was associated with intimal thickening and reductions in acetylcholine relaxation and PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  vascular expression. Atorvastatin treatment normalized triglyceride levels and reduced those of total cholesterol and LDL-cholesterol but was not able to normalize them. This drug also prevented reductions in acetylcholine relaxation and PPAR expression and reduced atherosclerotic lesion size. Neither dyslipidemia nor atorvastatin treatment modified PPAR $\beta/\delta$  expression.

**Conclusions.** These data suggest that dyslipidemia exerts varying effects on aortic PPAR expression, reducing PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  while not modifying PPAR $\beta/\delta$ . The increased PPAR $\alpha$  and  $\gamma$  expression observed with atorvastatin administration could mediate the anti-atherogenic effects exerted by this statin.

**Key words:**

Atherosclerosis. Endothelial dysfunction. Dyslipidemia. Statins. PPARs.

La dislipemia es uno de los factores desencadenantes del proceso aterosclerótico que afecta a diversas funciones de la pared vascular, entre ellas la función endotelial<sup>1-3</sup>. Las alteraciones de las funciones homeostáticas ejercidas por las células endoteliales o disfunción endotelial implican cambios en la regulación del tono vasomotor, del crecimiento y migración de las células del músculo liso, de la adhesión de leucocitos y de la función plaquetaria<sup>4,6</sup>. Todos estos cambios favorecen un proceso oxidativo e inflamatorio local que se asocia con la activación de ciertos genes y la liberación de múltiples

mediadores que participan en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis<sup>7</sup>.

Los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa reducen las concentraciones de colesterol total y de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), y como consecuencia ejercen efectos beneficiosos sobre la progresión y la complicación del desarrollo aterosclerótico<sup>5,6,8-10</sup>. Además del efecto hipolipemiente, las estatinas ejercen una serie de acciones directas o mediadas por la reducción de la producción de los isoprenoides, que se han dado en llamar acciones pleiotrópicas. Los efectos pleiotrópicos de las estatinas incluyen: la mejora de la disfunción endotelial, la reducción del proceso oxidativo e inflamatorio, acciones antitrombóticas y de estabilización de la placa de ateroma<sup>5,8-11</sup>. Todas estas acciones pueden contribuir a sus efectos beneficiosos sobre la enfermedad cardiovascular.

La familia de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR) está formada por 3 tipos:  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$  que se expresan en numerosos tejidos incluido el sistema cardiovascular<sup>12</sup>. Estos receptores nucleares regulan la expresión génica de numerosos mediadores implicados en el metabolismo lipídico y glucídico. Diversos estudios realizados con agonistas de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  (fibratos y glitazonas, respectivamente) han mostrado que además de sus acciones metabólicas ejercen efectos antiinflamatorios y antioxidantes<sup>13-16</sup>. Los PPAR $\beta/\delta$  son los más ubicuos y desempeñan un papel importante en el metabolismo lipídico mediante su participación en la oxidación de ácidos grasos, fundamentalmente, en el músculo esquelético<sup>12</sup>. Por tanto, en cierta medida, los agonistas de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  parecen ejercer ciertas acciones similares a las de las estatinas; por ello, se ha hipotetizado que la activación de estos receptores podría mediar algunas de las acciones de estos fármacos hipolipemiantes<sup>17-19</sup>. Aunque algunos estudios sugieren la participación de los PPAR $\alpha$  en el efecto antiinflamatorio<sup>20</sup> o el papel de los PPAR $\gamma$  en la acción antioxidante de las estatinas<sup>21</sup>, no se conoce bien el efecto de las estatinas sobre la expresión de estos factores de transcripción nuclear. Es más, no se conoce la posible modificación de la expresión vascular de los PPAR por aumento de las concentraciones de lípidos plasmáticos o su modificación durante el desarrollo aterosclerótico. Por ello, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la dislipemia sobre la expresión vascular de los PPAR así como el efecto del tratamiento con una estatina sobre éstos. Para ello, se estudió el efecto de atorvastatina sobre la función endotelial y la lesión ateros-

clerótica, así como la expresión aórtica de los PPAR- $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$  en conejos dislipémicos.

## Material y método

El estudio se realizó en 16 conejos machos de la cepa New Zealand (Granja Cunicular San Bernardo, Navarra), con un peso corporal de alrededor de 2 kg. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz y oscuridad (L:O, 12:12) y temperatura ( $22 \pm 2$  °C), con libre acceso al agua de bebida y alimentados con una dieta que contenía un 1% de colesterol (Mucedola s.r.l., Milán, Italia) durante 10 semanas. La mitad de los animales recibieron atorvastatina (1 mg/kg/día) en la comida durante el mismo período. Un grupo de animales alimentados con una dieta estándar se utilizó como grupo control ( $n = 8$ ). Todos los experimentos se aprobaron por el comité para el uso y el cuidado de animales de la Universidad Complutense, de acuerdo con el Real decreto 223/1988 sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. Al final del período de evolución, se tomaron muestras de sangre mediante un catéter insertado en la arteria de la oreja de los conejos en tubos que contenían ácido etilenediamin-tetracético (EDTA;  $10^{-7}$  mol/l). Después de recoger las muestras de sangre, se aisló la aorta en animales anestesiados (pentobarbital sódico, 25 mg/kg intravenoso [i.v.]) para la realización de estudios de reactividad vascular, estudios histológicos y la expresión génica.

## Perfil lipídico

Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol total y de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) se midieron mediante técnicas enzimáticas colorimétricas con kits comerciales (Spinreact; Gerona, España). La concentración de cLDL se calculó utilizando la fórmula de Friedewald (colesterol total-cHDL – triglicéridos/5).

## Función endotelial

Una vez aislada la aorta, se eliminó el tejido conectivo adherido a ella y se cortó transversalmente en anillos de 3-4 mm de longitud. Los anillos aórticos se colocaron en baños de órganos con una solución Krebs bicarbonatada a 37 °C y oxigenada (95% de  $O_2$  y 5% de  $CO_2$ ) con un pH fisiológico (7,4-7,6) y se conectaron a transductores de fuerza (modelo FT03, Grass) acoplados a un sistema computarizado (McLab modelo 8E, AD Instruments) para registrar los cambios en la tensión isométrica desarrollados. Los anillos se equilibraron durante un período de 60-90 min, durante el cual se cambió el buffer cada 15 min y se ajustó la tensión basal de los anillos a 2 g. Cuando la tensión isométrica fue estable, se iniciaron los experimentos y se obtuvo una respuesta contráctil de referencia a KCl (80 mmol/l). En anillos aórticos precontraídos con una dosis submáxima de fenilefrina ( $10^{-7}$  mol/l), se estudió la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a la acetilcolina ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/l) y la respuesta independiente de endotelio al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/l).

## Análisis morfológico

Se utilizaron segmentos de aorta torácica que se fijaron en etanol al 70% y posteriormente se incluyeron en parafina formando bloques para su tallado en secciones de 4 micras de grosor con un microtomo de rotación (Leitz 1512, IMEB INC, Chicago, EE.UU.). Los cortes se tiñeron con hematoxilina/eosina y tricrómico de Masson. Las medidas del área del vaso, el área de la luz y el área de la media se realizan con un analiza-

dor de imagen LEICA Q 500IW (Leica, España); para ello se capturaron las imágenes con una videocámara conectada a un microscopio, se digitalizaron y se valoraron las diferentes áreas<sup>5</sup>. Para la determinación del área de la luz, se midió el área delimitada por la lámina elástica interna y para el área del vaso se utilizó el área contenida por la lámina elástica externa. Se introdujo el factor de corrección  $L^2/4\pi$ , donde L es la longitud de la lámina interna o externa para evitar errores de cálculo en el área de la luz y del vaso debido a que los segmentos aórticos pueden deformarse durante su manejo.

## Aislamiento de ARN

Las aortas torácicas congeladas se pulverizaron con un mortero de acero inoxidable y siempre en contacto con nitrógeno líquido. Inmediatamente después, se pesaron 100 mg de tejido pulverizado y se homogeneizaron con 1 ml de tri-reagent (Molecular Research Center Inc. Cincinnati, OH, EE.UU.) utilizando un homogeneizador Potter de vidrio-teflón. El aislamiento de ARN se llevó a cabo según la metodología de Chomczynski<sup>22</sup>. Posteriormente el ARN se cuantificó midiendo la densidad óptica a 260 nm utilizando un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf, Germany). El ARN se conservó a -80 °C hasta su utilización.

## Reacción de la transcriptasa inversa

Se utilizaron 2 µg de ARN total para la obtención de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción inversa utilizando los reactivos aportados por el kit comercial Rteasy Reverse Transcription kit (Maxim Biotech. So. San Francisco, CA, EE.UU.). Siguiendo el protocolo del kit, se completó la muestra con agua estéril hasta un volumen final de 14,5 µl y se realizó una incubación previa de la muestra con 4 µl de oligo (dT) (50 µM) utilizados como cebadores a 70 °C durante 5 min; transcurrido este tiempo se enfrió la muestra en hielo. Posteriormente se añadió una mezcla de reacción compuesta por 10 µl de buffer RT 5X (Tris HCl 250 mM; pH = 8,3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM y DTT 50 mM), 0,5 µl de inhibidor de ARNasa (130U/µl), 20 µl de dNTPs (1 mM) y 1 µl de enzima retrotranscriptasa MMLV (virus de leucemia murina de Moloney) durante 1 h a 37 °C. Seguidamente, con el fin de inactivar la reacción, se calentó la muestra a 95 °C durante 10 min y, transcurrido este tiempo, se reenfrió a 4 °C en hielo. La mezcla se completó con 50 µl de agua libre de ADNasa. El ADNc sintetizado se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

## Análisis por RT-PCR cuantitativa (Real Time)

Para cuantificar las concentraciones de ARN mensajero se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas y en tiempo real utilizando un termociclador Real Time PCR Smart Cycler (Cepheid, Sunnyvale, California, EE.UU.). Para este análisis se utilizaron sondas TaqMan modificadas con una molécula fluorescente en el extremo 5' y con un *quencher* en el 3'. Los siguientes cebadores y sondas fueron sintetizados por Metabion (Munich, Alemania); PPAR $\alpha$ : 5'-GAGTTCCTCCAG-GAAATGG-3' (sentido), 5'-CACGGAGCCATCTGATCC-3' (antisentido), 5'-Cy3- TGAGGACAGCTCTGGAAGCTTCAG-BHQ2-3' (sonda); PPAR $\beta/\delta$ : 5'-CGAGAAGTGCAGCGGAG-3' (sentido), 5'-GTTGTGCGACATGCCCA-3' (antisentido), 5'-Fam-ATCCA-GAAGAAGAACCGCAACAAGTGCC-TMR-3' (sonda); PPAR $\gamma$ : 5'-CGGGATCGGCTCCGTGGATC-3' (sentido), 5'-CTCTTGCGA-ATGGAAGGTCT-3' (antisentido), 5'-Fam- CCTTTCAC-CACCGTGGACTTCTCCAGCA-BHQ1-3' (sonda); GADPH: 5'-GTCATCCCCGAGCTGAAC-3' (sentido), 5'-TCACCACCTTCTTG-ATGTCG-3' (antisentido), 5'-TexasRed-GGTCGTGGACCTGA

**Tabla 1. Concentraciones plasmáticas de colesterol en conejos control (CC), conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol (DL) y conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol y tratados con atorvastatina (1 mg/kg/día) (DL + ATV)**

	CT (mg/dl)	cLDL (mg/dl)	cHDL (mg/dl)	TG (mg/dl)
CC	31,7 ± 4	6,3 ± 1,1	19,8 ± 1,4	76,4 ± 5,2
DL	1.439,8 ± 47,4 <sup>a</sup>	1.257,5 ± 211,8 <sup>a</sup>	96,7 ± 7,6 <sup>a</sup>	149,2 ± 10,3 <sup>a</sup>
DL + ATV	1.037 ± 65 <sup>a,b</sup>	937,9 ± 6 <sup>a,b</sup>	88 ± 7 <sup>a</sup>	75,8 ± 13,3 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p < 0,05 frente a CC.

<sup>b</sup>p < 0,05 frente a DL.

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; CT: colesterol total; TG: triglicéridos.

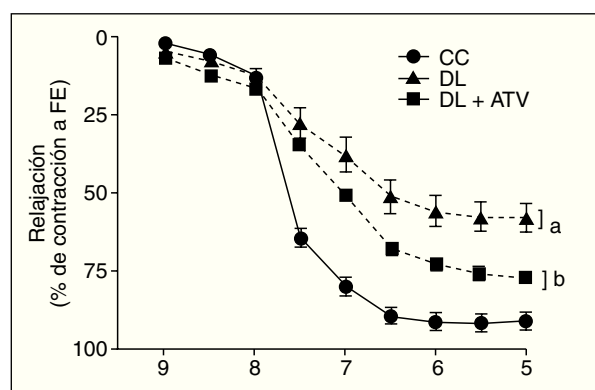
CCTGCCGCC-BHQ2-3' (sonda). En las condiciones de anillamiento la sonda hibridó con el ADN molde. En la extensión de los cebadores, la actividad exonucleasa de la Taq ADN polimerasa degrada la sonda resultando en la emisión de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia se corresponde con la cantidad de producto amplificado. Los valores obtenidos se normalizaron con la expresión de la GAPDH y se analizaron<sup>23</sup> mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

### Análisis estadístico

La respuesta relajante se expresó como el porcentaje de la reducción de la tensión en el anillo precontraído con fenilefrina. Los resultados se expresaron como la media ± EEM de los anillos de 8 conejos. Las curvas dosis-respuesta se compararon mediante un análisis de la varianza múltiple para medidas repetidas con el programa estadístico SPSS 14.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). El resto de los datos se analizaron mediante un análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA), seguido del test Newman-Keuls si había diferencias. Las diferencias se consideraron significativas cuando p < 0,05.

### Resultados

El incremento de las concentraciones de colesterol plasmáticas observado en los conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol se debió, fundamentalmente, a un aumento de los valores de cLDL (200 veces), aunque también se observó un incremento menor de las de cHDL (4 veces) (tabla 1). En consecuencia, los animales alimentados con una dieta enriquecida con colesterol presentaron un índice aterogénico (relación colesterol total/cHDL) mayor que los controles (14,8 ± 1,1 frente a 1,5 ± 0,1; p < 0,05). Asimismo, se observó un ligero incremento de las concentraciones de triglicéridos (2 veces) (tabla 1). El tratamiento concomitante con atorvastatina atenuó significativamente el incremento de las concentraciones plasmáticas de colesterol total (30%), aunque no fue capaz de normalizarlas. Esta reducción de las concentraciones de colesterol parecen deberse, fundamentalmente, a una reducción de la concentración de cLDL (-26%) ya que no se modificaron los valores de cHDL de manera significativa. En consecuencia, el índice aterogénico mejoró con la admi-



**Figura 1.** Relajación inducida por la acetilcolina ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/l) en anillos de aorta precontraídos con una concentración submáxima ( $10^{-6}$  mol/l) de fenilefrina (FE) de conejos control (CC), conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol (DL) y conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol y tratados con atorvastatina (1 mg/kg/día) (DL + ATV). <sup>a</sup>p < 0,05 frente a CC. <sup>b</sup>p < 0,05 frente a DL.

nistración de atorvastatina ( $10,8 \pm 1,6$  frente  $14,8 \pm 1,1$ , p < 0,05). El tratamiento con atorvastatina previno también el incremento de los valores de triglicéridos (tabla 1). Al final del experimento no se observaron diferencias significativas en el peso corporal entre los diferentes grupos (datos no incluidos).

La respuesta relajante a la acetilcolina fue menor en los anillos aórticos de los conejos dislipémicos que en los anillos de los conejos alimentados con una dieta control (fig. 1). La administración de la atorvastatina previno esta reducción (fig. 1). No se observaron diferencias en la respuesta relajante al nitroprusiato sódico entre los anillos de conejo dislipémicos y los anillos del grupo control. Asimismo, el tratamiento con atorvastatina no modificó dicha respuesta (datos no incluidos).

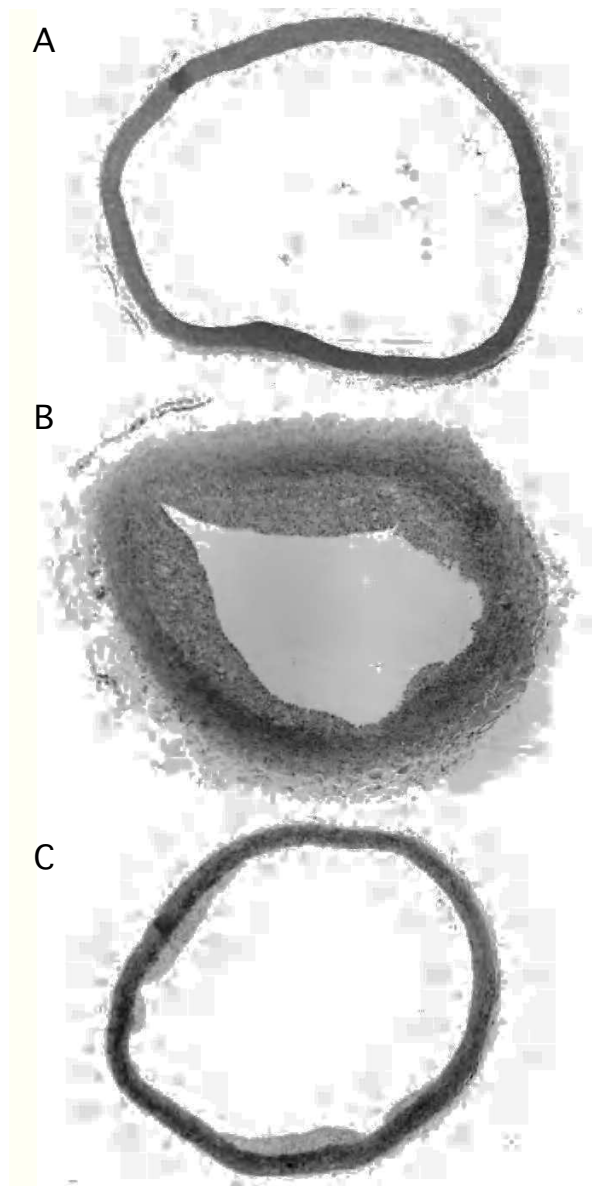
Como se observa en la tabla 2 y en la figura 2, la luz del vaso fue menor en las aortas de los conejos dislipémicos que en las aortas de los animales del

**Tabla 2. Área de la luz, relación media/luz (M/L), área de la lesión y porcentaje de estenosis en conejos control (CC), conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol (DL) y conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol y tratados con atorvastatina (1 mg/kg/día) (DL + ATV)**

	Luz (mm <sup>2</sup> )	M/L	Área lesión (mm <sup>2</sup> )	Estenosis (%)
CC	5,9 ± 0,16	0,325 ± 0,01		
DL	4,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,05 <sup>a</sup>	30,3 ± 5 <sup>a</sup>
DL + ATV	5,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,06 <sup>a,b</sup>	12,3 ± 1,6 <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>p < 0,05 frente a CC.

<sup>b</sup>p < 0,05 frente a DL.



**Figura 2.** Microfotografías representativas de la sección transversal de la aorta. A) Conejos control. B) Conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol. C) Conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol y tratados con atorvastatina (1 mg/kg/día). Aumento original  $\times 12,5$ .

grupo control, debido a que aproximadamente el 30% del área contenida en la lámina elástica interna está ocupado por la lesión aterosclerótica. No se observaron diferencias en el área del vaso, ni en el área de la media entre los grupos estudiados, por lo que la relación media/luz fue mayor en las aortas de los conejos dislipémicos que en los controles (tabla 2). El tratamiento con atorvastatina disminuyó el tamaño de la lesión y, en consecuencia, previno la reducción de la luz en los conejos dislipémicos (fig. 2 y tabla 2).

Los conejos dislipémicos presentaron una reducción significativa de la expresión aórtica de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  en comparación con los animales controles (fig. 3A y 3B). La administración de atorvastatina previno esta reducción. La expresión vascular de los PPAR $\beta/\delta$  no se modificó ni por la dieta con alto contenido en colesterol ni por el tratamiento con atorvastatina (fig. 3C).

## Discusión

Los datos del estudio muestran que la dislipemia inducida en conejos por una dieta con un 1% de colesterol se acompaña de disfunción endotelial y del engrosamiento de la íntima de la aorta, además de una reducción de la expresión vascular de los PPAR $\alpha$  y de los PPAR $\gamma$ . Asimismo, los resultados muestran que la administración de atorvastatina no sólo mejora las alteraciones funcionales y estructurales vasculares observadas en los conejos dislipémicos, sino que también normaliza la expresión vascular de los PPAR $\alpha$  y de los PPAR $\gamma$ , incluso en presencia de concentraciones elevadas de colesterol. Teniendo en cuenta los efectos descritos para los agonistas de los PPAR, estos datos podrían sugerir que un aumento de la expresión PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  podría participar en los efectos vasculares de la atorvastatina.

En estudios previos se ha demostrado que la administración de una dieta con un 1% de colesterol en conejos produce cambios en el perfil lipídico que se caracterizan por un aumento de las concentraciones de colesterol total, de cLDL y de triglicé-

ridos<sup>5,6</sup>. Estas alteraciones se acompañan de una reducción de la expresión aórtica de los PPAR $\alpha$  y de los PPAR $\gamma$ . Estos datos confirman un estudio previamente publicado en el que se observó que la hipercolesterolemia reducía tanto la expresión vascular como la actividad de estos factores en conejos<sup>21</sup>. De manera similar, la dislipemia disminuyó la expresión aórtica de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  en ratones *knockout* para apo E estimulados con angiotensina II<sup>24</sup> y en ratones *knockout* para los receptores de LDL y de leptina alimentados con una dieta con alto contenido en grasa<sup>25</sup>. Por tanto, estos datos sugieren que un aumento de las concentraciones de lípidos plasmáticos pueden regular negativamente la expresión génica de los PPAR. El mecanismo o los mecanismos implicados en esta regulación no se han establecido bien, aunque cabría sugerir que la acumulación intravascular exagerada de lípidos asociada con los cambios del perfil lipídico circulante observada en los conejos dislipémicos<sup>5</sup> podría modificar algunos de los mecanismos o factores que controlan la expresión de los PPAR.

Numerosos estudios han sugerido el papel modulador de los PPAR $\alpha$  y de los PPAR $\gamma$  en el desarrollo de la lesión aterosclerótica, demostrando que la administración de sus agonistas inhibe diferentes procesos implicados en la progresión de la placa como son: la expresión de moléculas de adhesión, el reclutamiento de leucocitos, la formación de macrófagos y la producción de citocinas, entre otras<sup>12-16</sup>. Asimismo, los agonistas de los PPAR mejoran la estabilidad y reducen la trombogenicidad de las placas mediante el aumento de la apoptosis de los macrófagos y la reducción de la expresión del factor tisular y de las metaloproteinasas<sup>12,13,16</sup>. Estos procesos son consecuencia, al menos en parte, de la capacidad que tienen estos agentes de inhibir la activación del factor nuclear  $\kappa$ B<sup>24</sup>. Una mejora de la función endotelial podría ser otro mecanismo implicado en la acción antiaterosclerótica de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ , ya que sus agonistas estimulan la producción de NO<sup>26-28</sup> y, en consecuencia, la activación de todos los efectos protectores que ejerce este factor endotelial en la pared vascular<sup>29</sup>. Por tanto, se podría sugerir que en los conejos dislipémicos, la reducción de la expresión vascular de estos factores nucleares, y en consecuencia de sus efectos a este nivel, podría favorecer el desarrollo aterosclerótico producido por una dieta con alto contenido en colesterol. En este sentido se ha observado que una reducción de la expresión vascular de los PPAR $\alpha$  y de los PPAR $\gamma$  se acompaña del engrosamiento de la íntima en diferentes modelos experimentales<sup>21,24,25</sup>.

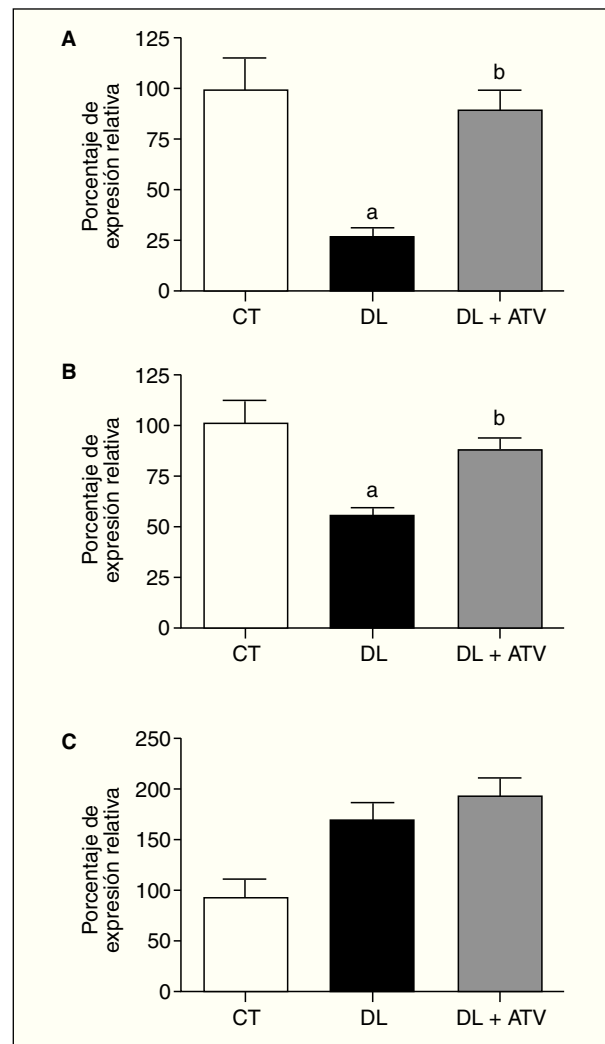


Figura 3. Expresión génica de PPAR $\alpha$  (A), PPAR $\gamma$  (B) y PPAR $\beta/\delta$  (C) por RT-PCR en tiempo real en aortas de conejos control (CC), conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol (DL) y conejos alimentados con una dieta enriquecida con colesterol y tratados con atorvastatina (1 mg/kg/día) (DL + ATV). <sup>a</sup>p < 0,05 frente a CC; <sup>b</sup>p < 0,05 frente a DL.

La observación de que la mejora de la lesión aterosclerótica y de la disfunción endotelial producida por la administración de atorvastatina se acompaña de un aumento de la expresión vascular de los PPAR $\alpha$  y de los PPAR $\gamma$ , refuerza la hipótesis anterior de que una disminución de los PPAR podría favorecer el desarrollo aterosclerótico en conejos dislipémicos. Asimismo, esta observación apoya el posible papel modulador de los lípidos intravasculares sobre la expresión génica de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ , ya que, aunque atorvastatina no normaliza las concentraciones plasmáticas de colesterol, es capaz de reducir de manera importante el contenido de lípidos



intra y extracelulares en el ámbito vascular<sup>5</sup>. Más aun, estos datos podrían sugerir la participación de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  en los efectos antiaterogénicos ejercidos por la atorvastatina. En este sentido diversos estudios han sugerido que el efecto hipolipemiente y antiinflamatorio de las estatinas podría ser mediado, en parte, por la activación de los PPAR $\alpha$ <sup>17-19</sup>. El posible mecanismo implicado en este proceso no está bien establecido, aunque se podría sugerir la participación de los efectos pleiotrópicos de las estatinas. Estos fármacos, además de inhibir la síntesis de colesterol, presentan acciones mediadas por la inhibición de la síntesis de importantes intermediarios isoprenoides, fundamentales para el anclaje a la membrana plasmática y el funcionamiento de una gran cantidad de proteínas implicadas en numerosos procesos celulares<sup>30</sup>. Estas acciones pleiotrópicas desempeñan un papel fundamental en la reducción de la lesión aterosclerótica y la mejora de la disfunción endotelial observada al aumentar la producción de NO, e inhibir la producción de las especies reactivas de oxígeno T $\gamma$ , de citocinas, la expresión de moléculas de adhesión, el reclutamiento de leucocitos y la formación de macrófagos<sup>5,8-11,30</sup>. Todos estos efectos son consecuencia de la modulación de diferentes factores de transcripción como el NF $\kappa$ B<sup>31,32</sup> y, finalmente, de toda una serie de vías de señalización que podrían regular también la expresión de los PPAR. En este sentido, se ha observado que la atorvastatina previene la reducción de la expresión cardíaca de los PPAR al inhibir la activación del NF $\kappa$ B en ratas con hipertrofia cardíaca<sup>33</sup>.

A diferencia de los PPAR $\alpha$  y de los PPAR $\gamma$ , cuyo papel protector en el desarrollo aterosclerótico se ha demostrado con el uso de sus agonistas, la participación de los PPAR $\beta/\delta$  en éste es menos conocido<sup>16</sup>. De todos los PPAR, los de tipo  $\beta/\delta$  son los más ubicuos y tienen un papel importante en el metabolismo lipídico. La administración de sus agonistas se asocia con un aumento de las concentraciones de cHDL y una reducción de las de triglicéridos y cLDL, por lo que se ha sugerido que podrían ser una diana en el tratamiento de la dislipemia<sup>34</sup>. A pesar de estas observaciones, en el presente estudio no se han observado cambios en la expresión vascular de este factor ni en los animales ateroscleróticos, ni en los tratados con atorvastatina, lo que sugiere que la expresión de este factor no está modulada por cambios en el perfil lipídico.

En resumen, los resultados del estudio muestran que el desarrollo aterosclerótico y la disfunción endotelial observada en los conejos dislipémicos se asocian a una reducción de la expresión vascular de los PPAR $\alpha$  y los PPAR $\gamma$ , lo que sugiere que una re-

ducción de la actividad de éstos podría favorecer el desarrollo aterosclerótico inducido por una dieta enriquecida con colesterol. Asimismo, los resultados muestran que el efecto de la atorvastatina sobre la reducción de la lesión y la mejora de la función endotelial se acompaña de un aumento de la expresión de los PPAR $\alpha$  y  $\gamma$ , lo que sugiere que el papel protector de la atorvastatina en la pared vascular podría ser mediado, en parte, por una activación de estos factores. Finalmente, los resultados demuestran que la hipercolesterolemia ejerce un efecto diferencial sobre la expresión vascular de los PPAR, y los PPAR  $\beta/\delta$  son los menos sensibles a ésta.

## Agradecimientos

Agradecemos la asistencia técnica de Antonio Carmona.

## Bibliografía

- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*. 1995;91:2488-96.
- Dart AM, Chin-Dusting JPF. Lipids and the endothelium. *Cardiovasc Res*. 1999;43:308-22.
- Aengevaeren WR. Beyond lipid. The role of the endothelium in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1999;147 Suppl 1:S11-6.
- Haller H. Endothelial function: general considerations. *Drugs*. 1997;53:1-10.
- Aragoncillo P, Maeso R, Vázquez-Pérez S, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Díaz C, et al. The protective role of atorvastatin on function, structure and ultrastructure in the aorta of dyslipidemic rabbits. *Virchow Arc*. 2000;437:545-54.
- Oubiña MP, de las Heras N, Cedié E, Sanz-Rosa D, Aragoncillo P, Díaz C, et al. Synergistic effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on inflammatory markers in atherosclerotic rabbits. *Clin Sci*. 2003;105:655-62.
- Von der Thüsen JH, Kuiper J, van Berkel TJ, Biessen EA. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol Rev*. 2003;55:133-66.
- Crisby M. Modulation of the inflammatory process by statins. *Drugs Today (Barc)*. 2003;39:137-43.
- Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1712-9.
- Ito MK, Talbert RL, Tsimikas S. Statin-associated pleiotropy: possible beneficial effects beyond cholesterol reduction. *Pharmacotherapy*. 2006;26 Pt 2:85S-97S.
- Lahera V, Goicochea M, Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem*. 2007;14:243-8.
- Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation*. 2007;115:518-33.
- Rizzo G, Fiorucci S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6:421-7.
- Schifffrin EL. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1037-43.
- Han SH, Quon MJ, Koh KK. Beneficial vascular and metabolic effects of peroxisome proliferator-activated receptor-activators. *Hypertension*. 2005;46:1086-92.
- Vosper H, Khoudoli GA, Graham TL, Palmer CNA. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*. 2002;95:47-62.

17. Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, et al. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest*. 2001;107:1423-32.
18. Kleemann R, Verschuren L, de Rooij BJ, Lindeman J, de Maat MM, Szalai AJ, et al. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPARalpha activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. *Blood*. 2004;103:4188-94.
19. Landrier JF, Thomas C, Grober J, Duez H, Percevault F, Soidi M, et al. Statin induction of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent. *J Biol Chem*. 2004;279:45512-8.
20. Paumelle R, Blanquart C, Briand O, Barbier O, Duhem C, Woerly G, et al. Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-a via inhibition of the protein kinase c signaling pathway. *Circ Res*. 2005;98:361-9.
21. Umeji K, Umemoto S, Itoh S, Tanaka MKS, Fukai T, Matsuzaki M. Comparative effects of pitavastatin and probucol on oxidative stress, Cu/Zn superoxide dismutase, PPAR-g, and aortic stiffness in hypercholesterolemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H2522-32.
22. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Bio-Techniques*. 1993;15:532-7.
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25:402-8.
24. Tham D, Martin-McNulty B, Wang YX, Wilson DW, Vergona R, Sullivan ME, et al. Angiotensin II is associated with activation of NF-kB-mediated genes and down regulation of PPARs. *Physiol Genomics*. 200;11:21-30.
25. Verreth W, de Keyser D, Pelat M, Verhamme P, Ganame J, Bielicki JK, et al. Weightloss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor-g correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. *Circulation*. 2004;110:3259-69.
26. Polikandriotis JA, Mazzela LJ, Rupnow HL, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1810-6.
27. Wang Y, Wang Y, Yang Q, Zhao C, Cianflone K, Wang DW. Effects of bezafibrate on the expression of endothelial nitric oxide synthase gene and its mechanisms in cultured bovine endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2006;187:265-73.
28. Murakami H, Murakami R, Kambe F, Cao X, Takahashi R, Arai T, et al. Fenofibrate activates AMPK and increases eNOS phosphorylation in HUVEC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341:973-8.
29. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide*. 2006;15:265-79.
30. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.
31. Ortego M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Díaz C, Hernández G, et al. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis*. 1999;147:253-61.
32. Haberbosch W, Tillmanns H, Muth H. Statins prevent NF-kappaB transactivation independently of the IKK-pathway in human endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2006;185:240-5.
33. Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Atorvastatin improves peroxisome proliferator-activated receptor signaling in cardiac hypertrophy by preventing nuclear factor-kappa B activation. *Biochem Biophys Acta*. 2005;1687:76-83.
34. Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, Villedor AF, Davis RA, Willson TM, et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest*. 2004;114:1564-76.