

La leptina reduce los valores de ARNm del receptor activado por proliferadores peroxisómicos γ en macrófagos humanos

A. Cabrero, M. Cubero, G. Llaverías, J.C. Laguna y M. Vázquez Carrera

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

Fundamento. Los valores elevados de leptina se asocian con un mayor riesgo cardiovascular en la obesidad a través de un mecanismo desconocido. La isoforma gamma del receptor activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR γ) desempeña un papel fundamental en la regulación del metabolismo lipídico en macrófagos y su activación por tiazolidindionas protege frente la aterosclerosis. El objetivo del presente estudio ha sido determinar el efecto de la leptina sobre los valores de ARNm de PPAR γ en cultivo primario de macrófagos humanos y en células espumosas derivadas de macrófagos.

Material y métodos. Se han utilizado cultivos primarios de monocitos humanos separados por centrifugación en gradiente de densidad a partir de *buffy coats* de donantes. Los monocitos así obtenidos se cultivan en suero humano inactivado durante 10 días para permitir su maduración a macrófagos y, posteriormente, se convierten en células espumosas por exposición a LDL acetiladas (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 48 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 tres experimentos.

Resultados. El tratamiento de macrófagos derivados de monocitos humanos con leptina (100 ng/ml) durante 24 h causó una reducción del 41% ($p < 0,01$) en los valores de ARNm de PPAR γ .

Este estudio se ha realizado gracias a la concesión de la beca de la Fundación Española de Arteriosclerosis 2000.

Correspondencia: Dr. M. Vázquez Carrera.
Unitat de Farmacología. Facultat de Farmàcia.
Universitat de Barcelona.
Diagonal, 643. 08028 Barcelona.
Correo electrónico: mvaz@farmacia.far.ub.es

Esta reducción iba acompañada de una disminución en la expresión del ARNm de la carnitina-palmitoiltransferasa I (CPT-I) (36%; $p < 0,05$), del ABCA1 (62%; $p < 0,05$) y del CD36 (34%), aunque para este último la reducción no fue estadísticamente significativa. El tratamiento de células espumosas derivadas de macrófagos con leptina (20 ng/ml) disminuyó los valores de mensajero del PPAR γ en un 33% ($p < 0,01$) y de la CPT-I en un 27% ($p \leq 0,05$). A esta concentración, la leptina no modificó la expresión de ABCA1 ni de CD36.

Conclusiones. Estos resultados parecen indicar que la reducción en la expresión de PPAR γ tanto en macrófagos como en células espumosas podría ser uno de los factores responsables de la asociación entre valores elevados de leptina y riesgo cardiovascular.

Palabras clave:
Leptina. Macrófagos. Células espumosas. PPAR γ . ABCA1. CD36.

LEPTIN DOWN-REGULATES PPAR γ IN HUMAN MACROPHAGES

Background. Increased leptin levels are associated with cardiovascular disease in obesity although the mechanism is unknown. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) is a key regulator of macrophage lipid metabolism and its activation by thiazolidinediones protects against atherosclerosis. The aim of this study was to assess the effects of human recombinant leptin on PPAR γ mRNA levels in primary human macrophages and macrophage-derived foam cells.

Material and methods. Human monocytes were isolated by gradient density centrifugation from

buffy coats of human donors. The mononuclear cells were then incubated with heat-inactivated human serum and on day 10 completely differentiated to macrophages. After that, differentiated macrophages were lipid-loaded during a 48-hour incubation with 150 μ g/ml acetyl-LDL. Relative levels of specific mRNAs were assessed by RT-PCR. Results are expressed as means \pm SD of 3 experiments.

Results. In human-derived macrophages leptin treatment (100 ng/ml) for 24 hours caused a 41% reduction ($p < 0.01$) in PPAR γ transcript levels. This fall was accompanied by a reduction in the mRNA expression of carnitine palmitoyltransferase (CPT-I) (36%, $p < 0.05$) and ABCA1 (62%, $p < 0.05$), whereas CD36 mRNA reduction (34%) was not significant. In macrophage-derived foam cells, leptin at 20 ng/mL reduced PPAR γ mRNA levels a 33% ($p < 0.01$) and CPT-I a 27% ($p \leq 0.05$). At this concentration, leptin did not modify the expression of either ABCA1 or CD36.

Conclusion. We propose that the reduction of PPAR γ expression in both macrophages and foam cells may be one of the factors linking high leptin levels and cardiovascular disease.

Key words:
Leptin. Macrophage. Foam cell. PPAR γ . ABCA1. CD36.

Introducción

El desarrollo de placas ateroscleróticas se caracteriza por la conversión de macrófagos derivados de monocitos en células espumosas¹. Este proceso está controlado por unos receptores nucleares denominados receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR), que actúan como factores de transcripción en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico². El PPAR α se expresa en células de la pared arterial, como macrófagos derivados de monocitos, células de la musculatura lisa y células endoteliales, y en el hígado, en el corazón, en el músculo y en el riñón, y es activado por fibratos, ácidos grasos y eicosanoïdes. El PPAR γ , además de expresarse en el tejido adiposo, también se expresa en macrófagos derivados de monocitos, y es activado por tiazolidindionas y ácidos grasos². En macrófagos, la activación de PPAR α y γ da lugar a una regulación transcripcional de genes implicados en el metabolismo lipídico y podría influir en el desarrollo y evolución de la aterosclerosis. Así, la activación de PPAR γ en macrófagos

induce la expresión transcripcional de CD36³, aunque este efecto no se traduce en una acumulación intracelular de colesterol⁴. Además, la activación de PPAR α y γ induce la expresión del gen que codifica para ABCA1, proteína implicada en el transporte inverso de colesterol y en el control de los valores plasmáticos de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), uno de los principales factores de protección frente a la aterosclerosis⁴. Esta regulación de ABCA1 por PPAR explica los efectos protectores frente la aterosclerosis producidos tanto por los activadores de PPAR α (fibratos)⁵, como de PPAR γ (tiazolidindionas)⁶.

La obesidad, definida como un incremento de la masa de tejido adiposo, se asocia con un incremento de la mortalidad y morbilidad cardiovascular^{7,8}. El tejido adiposo secreta numerosas proteínas como la leptina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), que podrían contribuir al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. La leptina es una hormona peptídica codificada por el gen *ob* y sintetizada mayoritariamente por los adipocitos. Esta hormona desempeña un papel muy importante en la regulación del balance energético, principalmente a través de la activación de los receptores para la leptina presentes en el hipotálamo⁹. Además, diferentes isoformas del receptor de la leptina se expresan en otros tejidos¹⁰, incluyendo los macrófagos¹¹, lo que sugiere que la leptina también presenta efectos extraneuronales. Por otro lado, diferentes estudios indican que la leptina es uno de los factores implicados en la asociación entre obesidad e incremento del riesgo cardiovascular^{12,13}, aunque los mecanismos responsables de esta asociación son desconocidos.

El objetivo del presente estudio ha sido determinar el efecto de la leptina sobre los valores de ARNm del PPAR γ y de sus genes diana implicados en el metabolismo lipídico, en cultivo primario de macrófagos humanos y en células espumosas derivadas de macrófagos. La leptina causó una disminución de los valores de ARNm del PPAR γ tanto en macrófagos como en células espumosas, aunque a diferentes concentraciones, sugiriendo que los efectos de esta hormona dependen del tipo celular. Además, este efecto de la leptina sobre la expresión de PPAR γ iba también acompañado por una disminución en la expresión de sus genes diana, como la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I), mientras que los valores de tránsrito de ABCA1 sólo se vieron significativamente reducidos en cultivo primario de macrófagos tratados con concentraciones elevadas de leptina. La disminución producida por

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos, número de ciclos de amplificación y tamaño de los fragmentos amplificados utilizados en este estudio

	Secuencias de oligonucleótidos	N.º de ciclos de amplificación		Tamaño del fragmento amplificado (pb)
		MØ	CE	
PPAR γ	Sentido 5'-CATTCTGGCCCACCAACTTTGG-3' Antisentido 5'-TGGAGATGCGAGGCTCCACTTG-3'	25	25	229
CPT-I	Sentido 5'-CAGGCCGTGGCCTTCAGTTC-3' Antisentido 5'-CCATGCTGAGAAGTGGCCGGG-3'	27	27	295
CD36	Sentido 5'-CTGTGACCGGAACTGTGGGCT-3' Antisentido 5'-GAAGATGGCACCATGGGCTG-3'	18	23	361
ABCA1	Sentido 5'-GGAGGCAATGGCACTGAGGAA-3' Antisentido 5'-CCTGCCTTGTGGCTGCAGTGT-3'	23	21	181
PPAR α	Sentido 5'-GGAAAGCCCCACTGTCCCCCT-3' Antisentido 5'-AGTCACCGAGGGAGGGCTCGA-3'	25	27	235
β -actina	Sentido 5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3' Antisentido 5-GATCTTGATCTCATGGTGTAGG-3'	20	23	764

la leptina en los valores de ARNm de PPAR γ y de sus genes diana podría contribuir en la asociación descrita entre concentraciones elevadas de leptina y enfermedad cardiovascular.

Material y métodos

Cultivo celular

Los cultivos primarios de macrófagos derivados de monocitos humanos se obtuvieron a partir de *buffy coats* de sangre periférica de donantes sanos del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Se diluyeron 15 ml de *buffy coat* con 20 ml de tampón fosfato salino estéril (sin calcio, magnesio ni bicarbonato) (Invitrogen) con 0,2 μ M de EDTA, y se depositaron sobre una capa de 12 ml de Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia). Después de una centrifugación (1.600 g durante 20 min a temperatura ambiente), se aísلا la banda de células mononucleares por aspiración y se lava tres veces con tampón fosfato salino estéril. El centrifugado de células mononucleares se resuspende en el medio A (RPMI 1.640 con L-glutamina y 25 mM de Hepes, suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 μ g/ml, un 1% de L-glutamina, un 1% de aminoácidos no esenciales y un 2% de piruvato sódico) (Invitrogen) y se cultiva a una densidad de $5,5 \times 10^6$ células/placa de 60 mm, durante 2 h a 37 °C, para permitir la adhesión de los monocitos a la placa de cultivo. Para eliminar las células no adheridas se lava la placa con tampón fosfato salino (con calcio y magnesio y sin bicarbonato) y se incuban con el medio A suplementado con un 20% (v/v) de suero humano AB inactivado (45 min a 56 °C) (Sigma). Después de 5 días de cultivo, el porcentaje de suero humano se reduce al 10%. Entre los días 10 y 11, los monocitos se han diferenciado completamente en macrófagos y se transforman en células espumosas mediante la incubación durante 48 h con 150 μ g/ml de lipoproteínas de baja densidad (LDL) acetiladas en medio A suplementado con un 1% (v/v) de suero humano AB inactivado.

Tanto los macrófagos como las células espumosas derivadas de macrófagos se trataron con una concentración de 20 o 100 ng/ml de leptina humana recombinante (Sigma) en medio A suplementado con un 10% (v/v) de suero humano AB inactivado durante 24 h y, posteriormente, se procedió a la extracción del ARN mediante el método descrito a continuación.

Lipoproteínas

Las LDL se obtuvieron mediante ultracentrifugación secuencial de suero humano¹⁴ y fueron acetiladas siguiendo el método descrito por Basu (1976).

Extracción y análisis de ARN

El ARN total se aisló mediante el reactivo Ultraspec (Biotechs). Los valores relativos de ARNm se determinaron mediante la reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). A partir de 0,5 μ g de ARN total se sintetizó el ADN complementario mediante su incubación con 125 ng de *random hexamers* (Promega) utilizados como cebadores de la reacción en presencia de tampón con 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de ditiotreitol, 200 U de la enzima transcriptasa inversa (M-MLV-RT, Invitrogen), 20 U de ARNsin (Invitrogen) y 0,5 mM de cada dNTP (Sigma) en un volumen final de 20 μ l. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante una hora. Una alícuota de 5 μ l de la reacción de RT se utilizó para la reacción de amplificación de PCR que contenía en un volumen final de 50 μ l: 1,2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 μ Ci [³²P] dATP (3.000 Ci/mmol, Amersham), 1 U de Taq ADN polimera (Invitrogen) y 0,5 μ g de cada oligonucleótido específico en presencia de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,5). Para evitar posibles hibridaciones inespecíficas, la enzima y el producto de la RT se separaron de los oligonucleótidos específicos y dNTP mediante una capa de parafina (los componentes de la reacción entran en contacto cuando la parafina funde a 60 °C). La reacción de PCR se inició con una desnaturización a 94 °C durante un minuto, seguida del ciclo de amplificación consistente en una desnaturización a 92 °C durante un minuto, una hibridación con los oligonucleótidos específicos a 60 °C durante un minuto y 15 s y una etapa de síntesis a 72 °C durante un minuto y 50 s. La reacción se terminó con 5 min de síntesis final a 72 °C. Un total de 5 μ l de la reacción de PCR fueron sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% y los productos de la amplificación fueron visualizados mediante autoradiografía (radiografías Kodak X-ray). Las secuencias específicas de los oligonucleótidos sentido y antisentido utilizados así como el número de ciclos de amplificación y el tamaño esperado del fragmento amplificado se presentan en la tabla 1. Para cada uno de los genes amplificados se han realizado estudios preliminares de número de ciclos de amplificación y cantidad de ADN complementario a amplificar para de-

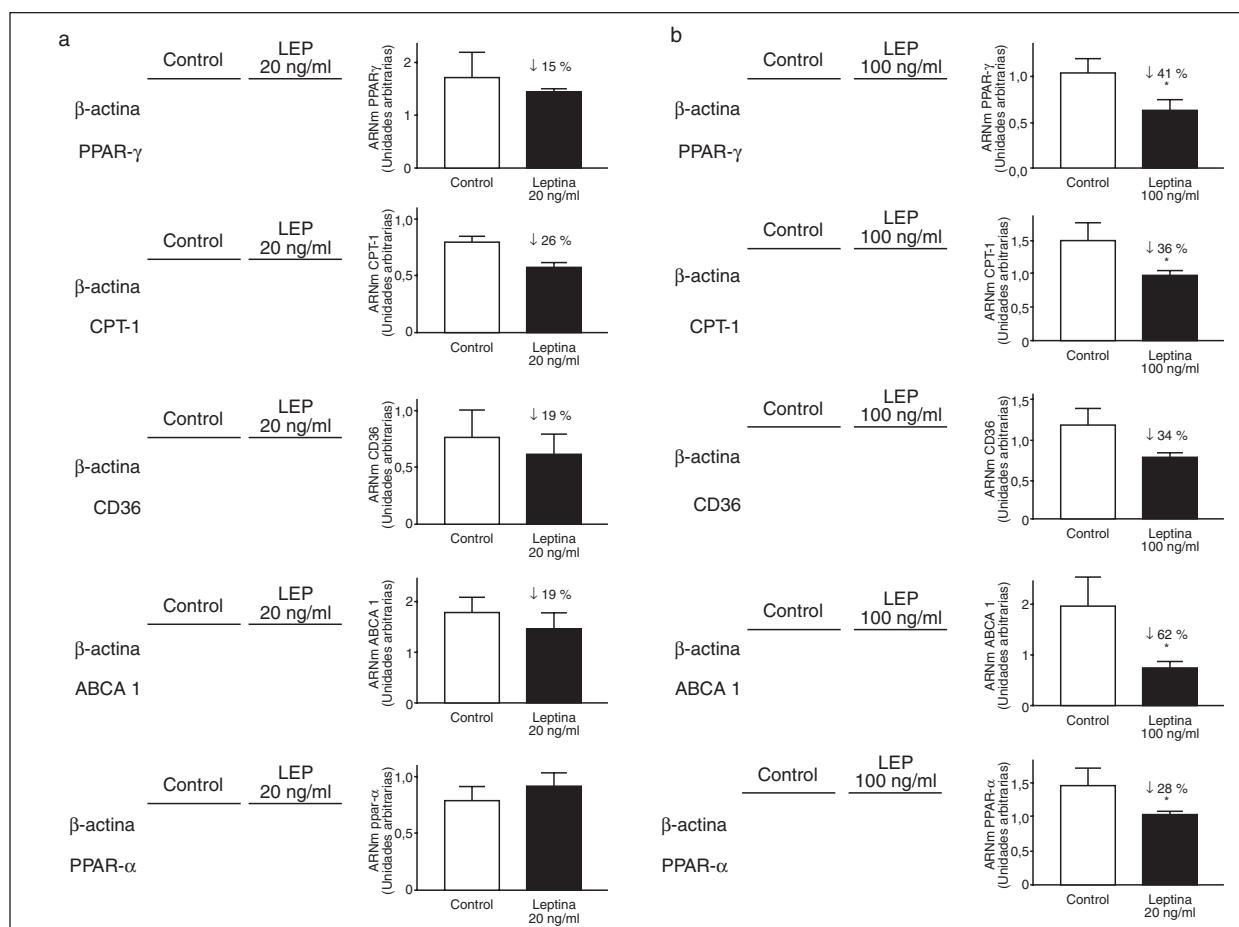


Figura 1. Efecto de la leptina sobre los valores de ARNm de PPAR γ , CPT-I, CD36, ABCA1 y PPAR α en cultivo primario de macrófagos derivados de monocitos humanos. Las células fueron incubadas durante 24 h con 20 (a) o 100 (b) ng/ml de leptina. Se analizaron 0,5 μ g de ARN total mediante RT-PCR. Se presenta una autorradiografía representativa del ensayo y la cuantificación relativa de los valores de ARNm normalizados con los del gen control β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos. *p < 0,05.

terminar las condiciones óptimas de trabajo (por debajo del límite de saturación). En estas condiciones, este método permite la cuantificación relativa del ARNm¹⁶. Las bandas radiactivas fueron cuantificadas por densitometría (Vilbert Lourmat Imaging). Los resultados se expresan como los valores de ARNm de cada uno de los genes estudiados normalizados con los del gen control (β -actina).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos. Las diferencias significativas se establecen mediante el estudio estadístico de la t de Student.

Resultados

El objetivo principal de este estudio ha sido determinar el efecto de la leptina sobre los valores de ARNm del PPAR γ en cultivo primario de macrófagos derivados de monocitos humanos y en células

espumosas. Para establecer el efecto biológico de la leptina *in vitro* se trataron estos dos modelos celulares con concentraciones de 20 y 100 ng/ml de leptina humana recombinante. El tratamiento de macrófagos derivados de monocitos humanos con 20 ng/ml de leptina causó una disminución no significativa del 15% de los valores de ARNm de PPAR γ (fig. 1a). En cambio, los valores de ARNm de CPT-I, gen que cataliza la entrada de ácidos grasos dentro de la matriz mitocondrial y cuya expresión es regulada por PPAR α y PPAR γ ⁴, disminuyeron un 26% (p < 0,01) (fig. 1a). Además, en macrófagos, la leptina también causó una pequeña disminución de los valores de ARNm de dos genes diana de PPAR γ , CD36 (19%) y ABCA1 (19%), aunque las diferencias no fueron significativas. El tratamiento de macrófagos con 100 ng/ml de leptina produce un perfil de cambios similar al descrito tras el tra-

tamiento con 20 ng/ml de leptina, pero con una mayor intensidad (fig. 1b). Así, tras el tratamiento con 100 ng/ml de leptina los valores de ARNm de PPAR γ resultaron significativamente reducidos en un 41% ($p < 0,05$) (fig. 1b). Esta reducción en los valores del transcripto de PPAR γ iba acompañada de una reducción de los valores de ARNm de ABCA1 (62%; $p < 0,05$), de CPT-I (36%; $p < 0,05$) y de CD36 (34%), aunque para este último la reducción no fue significativa ($p < 0,07$) (fig. 1b). Además, la leptina también disminuyó los valores de ARNm de PPAR α en un 28% ($p < 0,05$) (fig. 1b). Dado que la formación de células espumosas, proceso caracterizado por la acumulación de ésteres de colesterol en el citoplasma de los macrófagos, está modulada por PPAR a través de la regulación del flujo de colesterol, decidimos estudiar el efecto de la leptina sobre los valores de ARNm de PPAR y de sus genes diana en estas células. Las células espumosas se obtuvieron mediante la incubación de los macrófagos con 150 μ g de LDL acetiladas/ml durante 48 h. Posteriormente, las células fueron tratadas con 20 ng/ml de leptina durante 24 h. El tratamiento de las células espumosas derivadas de macrófagos con 20 ng/ml de leptina causó una reducción en los valores de ARNm de PPAR γ de un 33% ($p < 0,01$) (fig. 2a), lo que indica que este tipo celular es más sensible a las acciones de la leptina que los macrófagos. Los valores de ARNm de CPT-I también se vieron reducidos en un 27% ($p \leq 0,05$) (fig. 2b), mientras que los de los transcritos de CD36, ABCA1 y PPAR α no se modificaron de forma significativa (fig. 2b).

Discusión

En este estudio se describe cómo un tratamiento de corta duración con leptina disminuye los valores de ARNm de PPAR γ en cultivo primario de macrófagos derivados de monocitos humanos. Esta disminución va acompañada de una reducción de la expresión de diferentes genes diana de este factor de transcripción, incluyendo la disminución de los valores de ARNm de ABCA1 en macrófagos después del tratamiento con 100 ng/ml de leptina. La reducción en la expresión de PPAR γ producida por la leptina podría contribuir a explicar la asociación recientemente descrita entre valores elevados de leptina y mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares en la obesidad¹². Una de las principales características de la formación de la placa aterosclerótica es la conversión de macrófagos en células con elevada capacidad de acumular lípidos en su interior, llamadas células espumosas. Este proceso es controlado principalmente por los PPAR, recep-

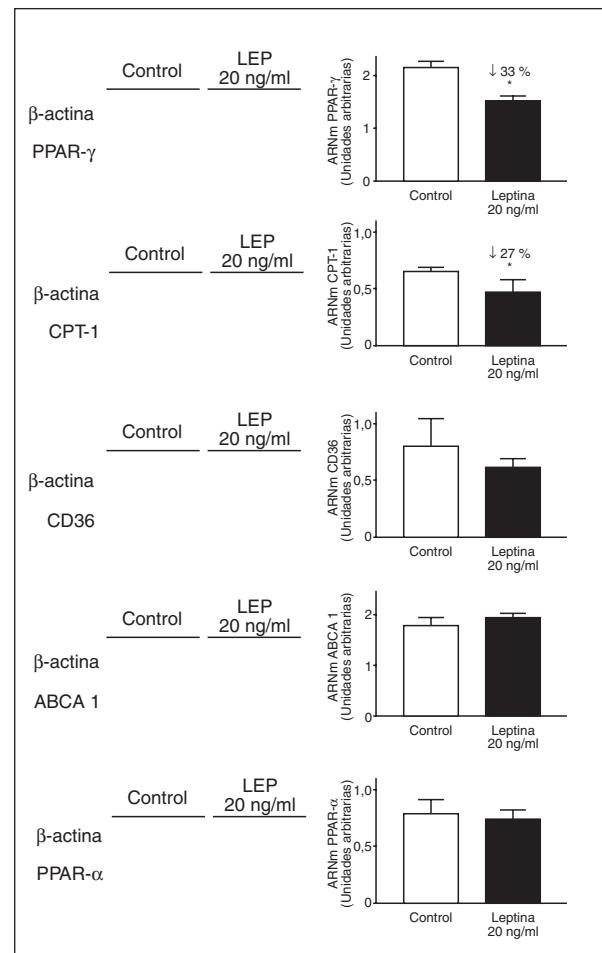


Figura 2. Efecto de la leptina sobre los valores de ARNm de PPAR γ , CPT-I, CD36 y ABCA1 en células espumosas derivadas de macrófagos humanos. Las células fueron incubadas durante 24 h con 20 ng/ml de leptina. Se analizaron 0,5 μ g de ARN total mediante RT-PCR. Se presenta una autorradiografía representativa del ensayo y la cuantificación relativa de los valores de ARNm normalizados con los del gen control β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos. * $p < 0,05$.

tores que regulan el metabolismo lipídico en macrófagos⁴. El papel de los PPAR en la aterosclerosis es controvertido, ya que la activación de PPAR γ conduce a una mayor diferenciación de los macrófagos, y por tanto a la inducción de la expresión de CD36³, que es un receptor *scavenger* para las LDL aterogénicas. Sin embargo, ni la activación de PPAR γ ni de PPAR α inducen la formación de células espumosas a partir de macrófagos derivados de monocitos humanos⁴. De hecho, actualmente se cree que el efecto potencialmente proaterogénico del incremento en la expresión de CD36 por activación de PPAR γ es contrarrestado por una reduc-

ción en la expresión de un segundo receptor *scavenger* de LDL, el SR-A, y por la inducción de ABCA1, proteína implicada en la salida de colesterol de las células. Estos datos sugieren un papel antiaterogénico de los PPAR en macrófagos, tal y como se ha descrito al observar la reducción de la aterosclerosis en ratones y pacientes tratados tanto con activadores de PPAR α^5 o de PPAR γ^6 . Por ello, la reducción descrita en la expresión de PPAR γ en macrófagos y en células espumosas derivadas de macrófagos después del tratamiento con leptina podría acelerar el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Los resultados de este estudio también demuestran que las células espumosas son más sensibles a los efectos de la leptina sobre la expresión de PPAR γ que los macrófagos, en los cuales se obtiene un efecto similar sólo cuando la concentración de leptina utilizada es de 100 ng/ml. Esta concentración de 100 ng/ml de leptina está lejos de los valores fisiológicos encontrados en individuos no obesos, pero próxima a los valores descritos en pacientes obesos¹⁷.

La reducción en los valores de ARNm de PPAR γ después del tratamiento de macrófagos con leptina concuerda con la reducción de la expresión de PPAR γ observada en los adipocitos de ratas con hipertrehinemia¹⁸. De hecho, los macrófagos y los adipocitos presentan características similares. Ambos tipos celulares expresan las mismas moléculas especializadas, incluyendo el CD36 y citocinas como el TNF- α . Por otro lado, tanto los macrófagos como los adipocitos acumulan grandes cantidades de lípidos en su interior y su diferenciación está mediada por PPAR γ . Además, los macrófagos expresan genes típicos de los adipocitos, como son aP2 y adiponilina, que están bajo control del PPAR γ , tal y como ocurre en los adipocitos^{19,20}. En consecuencia, los resultados presentados en este trabajo sugieren que el PPAR γ presenta una respuesta similar a la leptina tanto en adipocitos como en células espumosas derivadas de macrófagos.

La expresión de genes diana de PPAR γ , como el CD36 y el ABCA1, sólo resultó afectada en macrófagos tratados con 100 ng/ml de leptina, aunque para el primero la reducción fue sólo ligeramente significativa. La activación de PPAR α y PPAR γ regula la expresión de ABCA1 a través del receptor LXR α^4 . Dado que la reducción en la expresión de ABCA1 sólo se produce con concentraciones de leptina que disminuyen los valores de ARNm de PPAR α y PPAR γ , estos resultados sugieren que la reducción en ABCA1 sólo tiene lugar cuando los valores de ambos factores de transcripción están reducidos. Además, dado el papel de ABCA1 en el

control de los valores plasmáticos de HDL, serían necesarios trabajos complementarios para estudiar cómo los valores elevados de leptina pueden contribuir a la asociación descrita entre obesidad y concentraciones disminuidas de HDL²¹. Es interesante resaltar que la combinación de valores elevados de leptina y bajos de Apo A-I se ha asociado con un pronunciado incremento del riesgo de un tipo de infarto de miocardio agudo¹². Si los resultados presentados en este trabajo se confirman *in vivo*, la asociación entre valores elevados de leptina, que se traduce en una reducción en la expresión de PPAR γ y de ABCA1, y bajos de Apo A-I, que median el flujo de colesterol en los macrófagos, en parte a través de un mecanismo relacionado con ABCA1, podrían afectar profundamente a este proceso, y de esta manera acelerar el desarrollo de aterosclerosis.

El tratamiento con ambas concentraciones de leptina también afectó a la expresión de CPT-I. Este gen, regulado por PPAR γ , controla la entrada de ácidos grasos dentro de la mitocondria donde posteriormente serán oxidados. La expresión reducida de CPT-I después del tratamiento con leptina podría dar lugar a la acumulación de los derivados CoA de los ácidos grasos en el citoplasma, y en consecuencia producir un incremento en la disponibilidad de los ácidos grasos para ser posteriormente esterificados con colesterol.

En resumen, estos resultados muestran que la leptina disminuye la expresión de los valores de ARNm de PPAR γ en macrófagos humanos. Dado que este factor de transcripción desempeña un papel importante en la regulación del eflujo de colesterol en macrófagos, su reducción tras tratamiento con leptina podría ser uno de los factores implicados en la asociación descrita entre valores elevados de leptina y el mayor riesgo cardiovascular en la obesidad.

Bibliografía

1. Guyton J R. The arterial wall and the atherosclerotic lesion. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:376-81.
2. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649-88.
3. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez J, Thomazy V, Evans R. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93:241-52.
4. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Pineda Torra I, et al. PPAR α and PPAR γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Med* 2001;7:53-8.
5. Ericsson CG, Hamsten A, Nilsson J, Grip L, Svane B, De Faire U. Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression

- of coronary artery disease in young male postinfarction patients. *Lancet* 1996;347:849-53.
6. Rosen ED, Spiegelman BM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ligands and atherosclerosis: ending the heartache. *J Clin Invest* 2000;106:629-31.
 7. McGill HC, McMahan CA, Malcom GT, Oalmann MC, Strong JP. PDAY Research Group. Relation to glycohemoglobin and adiposity to atherosclerosis in youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:431-8.
 8. Jensen NS. Obesity and cardiovascular disease: is body structure a factor? *Curr Opin Lipidol* 1997;8:200-4.
 9. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996;45:1455-62.
 10. Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Kongrad A, Chiesi M. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-R a , b, and e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:648-52.
 11. Lee FJ, Li Y, Yang EK, Yang SQ, Lin HZ, Trush MA, et al. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient, obese mice. *Am J Physiol* 1999;276:C386-95.
 12. Söderberg S, Ahrén B, Jansson J-H, Johnson O, Hallmans G, Asplund K, et al. Leptin is associated with increased risk of myocardial infarction. *J Intern Med* 1999;246:409-18.
 13. Leyva F, Godslan IF, Ghatei M, Proudler AJ, Aldis S, Walton C, et al. Hyperleptinemia as a component of a metabolic syndrome of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:928-33.
 14. Vázquez M, Zambón D, Hernández Y, Adzet T, Merlos M, Ros E, et al. Lipoprotein composition and oxidative modification during therapy with gemfibrozil and lovastatin in patients with combined hyperlipidaemia. *Br J Clin Pharmacol* 1998;45:265-9.
 15. Basu SK, Goldstein JL, Anderson RG, 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.
 16. Freeman WM, Walker SJ, Kent EV. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 1999;26:112-25.
 17. Krempel F, Breban D, Oberkofler H, Esterbauer H, Hell E, Paulweber B, et al. Leptin, peroxisome proliferator-activated γ and CCAAT/enhancer binding protein- α mRNA expression in adipose tissue of humans and their relation to cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:443-9.
 18. Zhou Y-T, Whang Z-W, Higa M, Newgard CB, Unger RH. Reversing adipocyte differentiation: implications for treatment of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2391-5.
 19. Pelton PD, Zhou L, Demarest KT, Burris T. PPAR γ activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:456-8.
 20. Wang X, Reape TJ, Li X, Rayner K, Webb CL, Burnand KG, et al. Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions. *FEBS Lett* 1999;462:145-50.
 21. Barter PJ, Rye KA. High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996;121:1-5.