

# Avasimibe, un nuevo inhibidor de la ACAT, y atorvastatina actúan sinérgicamente reduciendo el contenido de ésteres de colesterol en macrófagos humanos THP-1

G. Llaverías, M. Jové, C. Díaz<sup>a</sup>, G. Hernández<sup>a</sup>, J.C. Laguna y M. Alegret

Unidad de Farmacología. Departamento de Farmacología y Química Terapéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. <sup>a</sup>Departamento I+D. Pfizer S.A. Barcelona. España.

---

**Fundamento y objetivo.** Existen evidencias de que la inhibición conjunta de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT) y de la hidroximetil glutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa produce un efecto antiaterosclerótico directo de forma sinérgica en la pared vascular. El objetivo de este estudio ha sido determinar el efecto de un nuevo inhibidor de la ACAT (avasimibe), solo o en combinación con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (atorvastatina), sobre la acumulación de ésteres de colesterol en un modelo in vitro de macrófagos humanos.

**Métodos.** Los macrófagos THP-1 se incubaron de dos formas: a) simultáneamente con LDL acetiladas y el(los) fármaco(s) en presencia y en ausencia de HDL durante 48 h, o b) en una primera fase con LDL acetiladas, para permitir la carga lipídica, seguido de una incubación con el fármaco en presencia de HDL durante otras 48 h (incubación secuencial). A partir del lisado celular se extrajeron los lípidos y se determinaron los contenidos de colesterol libre y total por cromatografía de gases. El contenido en ésteres de colesterol se calculó por diferencia entre el colesterol total y el libre. La viabilidad celular se determinó por el método de MTT.

**Resultados.** En macrófagos incubados simultáneamente con LDL acetiladas, avasimibe (0,01-0,5  $\mu$ M) produjo una disminución

dependiente de la concentración del contenido de colesterol esterificado, que no fue acompañada de un incremento en el colesterol libre intracelular. La adición de atorvastatina 5  $\mu$ M potenció alrededor de 2 veces la capacidad de avasimibe 0,5  $\mu$ M de reducir la masa de colesterol esterificado, efecto que fue revertido por la adición de mevalonato 200  $\mu$ M o geranil-geraniol 10  $\mu$ M.

**Conclusiones.** En función de estos datos, se propone que el sinergismo entre inhibidores de la ACAT y de la HMG-CoA reductasa descrito en algunos estudios in vivo se podría explicar por un efecto aditivo directo de los dos fármacos en la reducción del contenido lipídico de los macrófagos presentes en el área de lesión ateromatosa.

**Palabras clave:**

Avasimibe. Atorvastatina. ACAT. HMG-CoA reductasa. Macrófago. Ésteres de colesterol.

---

## AVASIMIBE, A NOVEL ACAT INHIBITOR, AND ATORVASTATIN ACT SINERGISTICALLY TO REDUCE CHOLESTERYL ESTER CONTENT IN THP-1 HUMAN MACROPHAGES

**Background and objective.** There are evidences that the inhibition of both acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) and hydroxymethyl glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase cause a synergistic direct antiatherosclerotic effect on the vessel wall. The aim of this study was to assess the effect of the ACAT inhibitor (avasimibe), alone and in combination with an HMG-CoA reductase inhibitor (atorvastatin), on cholesteryl ester (CE)

---

Correspondencia: Dra. M. Alegret Jordà.  
Unidad de Farmacología. Facultad de Farmacia.  
Diagonal, 643. 08028 Barcelona. España.  
Correo electrónico: alegret@farmacia.far.ub.es

content in an in vitro model of human macrophages.

**Methods.** THP-1 macrophages were incubated: a) with acetyl-LDL simultaneously with the drug(s)  $\pm$  HDL, during 48 h, or b) with acetyl-LDL to allow lipid enrichment, followed by a further incubation with the drug(s) under study for 48 h, in the presence of HDL (sequential incubation). Cellular lipids were extracted and both free and total cholesterol mass were quantified by gas chromatography. CE mass was determined from the difference between total and free cholesterol. Cell viability was assessed by the MTT method.

**Results.** In macrophages incubated simultaneously with acetyl-LDL, avasimibe (0,01-0,5  $\mu$ M) caused a concentration-dependent reduction in cell cholesteryl ester content, that was not accompanied by an increase in intracellular free cholesterol. 5  $\mu$ M atorvastatin enhanced by approximately 2-fold the ability of 0.5  $\mu$ M avasimibe to reduce the mass of esterified cholesterol. This effect was reversed by co-incubation with 200  $\mu$ M mevalonate or 10  $\mu$ M geranyl-geraniol.

**Conclusions.** Based on these data, we propose that the synergism between ACAT and HMG-CoA reductase inhibitors found in several in vivo studies could be explained by a direct additive effect of both agents reducing the lipid content of the macrophages present in the atheromatous lesion area.

#### Key words:

Avasimibe. Atorvastatin. ACAT. HMG-CoA reductase. Macrophage. Cholesteryl ester.

## Introducción

A pesar de la extensa utilización de fármacos como las estatinas, capaces de disminuir de forma significativa los valores de lípidos plasmáticos y la mortalidad cardiovascular, la arteriosclerosis continúa siendo una de las principales causas de muerte en los países industrializados<sup>1-3</sup>. Por ello, resulta necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra esta enfermedad, como la inhibición de la enzima acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT).

La ACAT se localiza en el retículo endoplasmático y cataliza la esterificación de colesterol con derivados CoA de ácidos grasos de cadena larga<sup>4</sup>. Existen dos isoformas de la enzima ACAT: ACAT1, ampliamente distribuida en el organismo (hígado, páncreas, macrófagos y tejidos esteroideogénicos), y

ACAT2, que sólo se expresa en hígado e intestino<sup>5</sup>. La actividad ACAT es la principal responsable de la esterificación de colesterol en células intestinales y hepatocitos, por lo que su inhibición provocaría una reducción de la absorción de colesterol de la dieta y de la producción de VLDL en el hígado; como consecuencia de ambos efectos, disminuirían los valores plasmáticos de colesterol.

Por otro lado, la ACAT, más concretamente la isoforma ACAT1, se encuentra también implicada en la síntesis y el almacenamiento de ésteres de colesterol en macrófagos<sup>6</sup>. La acumulación de grandes cantidades de colesterol esterificado en el citosol transforma los macrófagos en células espumosas, componentes mayoritarios de las estrías grasas, que constituyen las lesiones ateroscleróticas iniciales. Teniendo en cuenta que en el proceso de formación de células espumosas se produce un exceso de esterificación de colesterol por la ACAT, la inhibición de esta actividad enzimática podría contribuir a la prevención de este fenómeno<sup>7,8</sup>. De este modo, además de su efecto hipolipemiante, los inhibidores de la ACAT pueden ser considerados como agentes antiateroscleróticos con acción directa en la pared arterial<sup>1,2,9</sup>.

La combinación de inhibidores de la ACAT y estatinas parece ser una mejor estrategia terapéutica respecto a la monoterapia con inhibidores de la ACAT<sup>10</sup>. Las estatinas son los agentes más comúnmente prescritos para el tratamiento de la hipercolesterolemia debido a su alta eficacia y seguridad<sup>11</sup>. Son inhibidores de la hidroximetil-glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa, lo que comporta la aparición de numerosos efectos pleiotrópicos, debido a la inhibición de diversos metabolitos intermediarios de la vía de síntesis del colesterol<sup>12,13</sup>. Algunos de estos efectos pueden interferir directamente con el proceso aterosclerótico, de forma independiente de la acción hipocolesterolemizante de las estatinas<sup>12</sup>. Por tanto, la inhibición conjunta de la ACAT y de la HMG-CoA reductasa potenciaría no sólo el efecto hipolipemiante del inhibidor de la ACAT, sino también los efectos antiateroscleróticos directos de ambos agentes en la pared arterial. Por este motivo, varios autores<sup>10,14,15</sup> han estudiado el efecto de la combinación de un inhibidor de la ACAT y una estatina en diferentes modelos animales; por otra parte, en la actualidad se está llevando a cabo estudios clínicos para verificar la seguridad y la eficacia de esta terapia combinada<sup>3</sup>. Debe tenerse en cuenta que en los estudios in vivo, la inhibición de la ACAT puede afectar a diferentes sistemas celulares (hígado, intestino y células arteriales), lo que dificulta determinar con exactitud la contribución de cada uno de ellos a los efectos finales observados.

El objetivo de este estudio ha sido valorar el efecto de un nuevo inhibidor de la ACAT (avasimibe) y de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (atorvastatina), por separado y en combinación, sobre la acumulación de colesterol en un modelo in vitro de macrófagos humanos. Este sistema celular se ha escogido por su papel crucial en el inicio y la progresión del proceso aterosclerótico. El uso de un modelo in vitro permite eludir el efecto hipocolesterolemiante que tendría lugar in vivo, y evaluar los efectos farmacológicos de ambas sustancias en un sistema celular aislado.

## Material y métodos

Avasimibe (ácido [[2,4,6-tris(1-metiletil)fenil]acetil]sulfámico, 2,6-bis(1-metiletil)fenil éster), estructura que se detalla en la figura 1, y atorvastatina han sido proporcionados por Parke-Davis, Inc., Ann Arbor, MI (actualmente Pfizer). Los reactivos usados para el cultivo celular son de Gibco, Life Technologies (Paisley, Escocia), con excepción del 4-beta phorbol 12 beta miristato 13 alfa acetato (PMA), obtenido de Sigma Co. (Madrid). El colestanol y el bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) también son de Sigma. La piridina se obtuvo de Merck (Barcelona), y el Syton BTZ de Supelco (Bellefonte, EE.UU.).

### Lipoproteínas

Las LDL (d = 1.006-1.063) y las HDL (d = 1.063-1.21) se obtuvieron a partir de plasma de donantes sanos por ultracentrifugación secuencial<sup>16</sup>, se dializaron en tampón fosfato salino (PBS), y su concentración proteica se valoró por el método de Bradford<sup>17</sup> usando albúmina sérica bovina como estándar. Las LDL se acetilaron según el método de Basu et al<sup>18</sup>, se dializaron y se procedió a su concentración mediante el sistema de filtros Millipore Centriplus<sup>19</sup>. El grado de acetilación fue confirmado por el aumento en la movilidad electroforética respecto a las LDL nativas en un gel de agarosa al 1% en tampón barbital<sup>20</sup>.

### Cultivo celular

La línea celular de leucemia monocítica humana THP-1 se obtuvo de la American Type Culture Collection, y se mantuvo en medio RPMI 1640 con L-glutamina suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Myoclon super plus FBS, EE.UU.), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin a 37° C y un

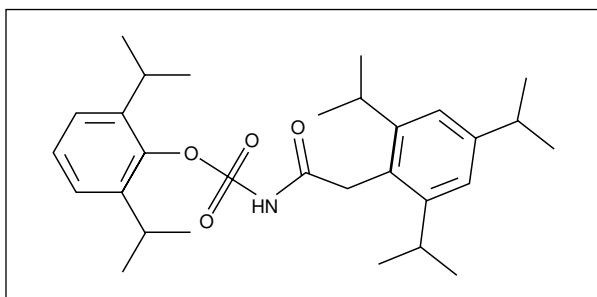


Figura 1. Estructura química del inhibidor de la ACAT avasimibe (ácido [[2,4,6-tris(1-metiletil)fenil]acetil]sulfámico, 2,6-bis(1-metiletil)fenil éster).

5% de CO<sub>2</sub>. La diferenciación de monocitos a macrófagos se realizó por exposición de las células a 50 ng/ml de PMA durante 72 h<sup>21</sup>. Cuarenta y ocho horas después de la diferenciación, los macrófagos se incubaron siguiendo dos modelos<sup>22</sup>: a) incubación secuencial, en el cual las células se convirtieron inicialmente en células espumosas por exposición a 150 µg/ml de LDL acetiladas (acetil-LDL) durante 48 h. Después de 3 lavados, se incubaron las células durante otras 48 h con avasimibe, atorvastatina o una combinación de los dos fármacos, en presencia de 200 µg/ml de HDL, y b) incubación simultánea, en la que las células se trataron simultáneamente con 150 µg/ml de acetil-LDL y el fármaco o fármacos, en presencia o ausencia de HDL en el medio de cultivo, durante 48 h. Las soluciones de fármacos se prepararon de forma que la concentración final en el medio de cultivo fuera del 0,1% de DMSO. La viabilidad celular se determinó por el método MTT<sup>23</sup>.

### Determinación del contenido intracelular de colesterol

Después de los tratamientos, se recogieron las células en PBS y se procedió a la obtención del lisado celular (sonicador Branson 450, 3 × 10 s, 25 w). Una alícuota del lisado se usó para la determinación de la proteína celular por el método de Bradford<sup>17</sup>. Al resto del lisado celular se le añadió un estándar interno de colestanol, y se extrajeron los lípidos con cloroformo/metanol (2:1 v/v)<sup>24</sup>. De cada extracto lipídico se hicieron dos partes iguales y una de ellas se sometió a un proceso de saponificación<sup>25</sup>, se secó bajo nitrógeno y se usó para la determinación del colesterol total. Los extractos no saponificados se utilizaron para determinar el contenido celular en colesterol libre. En ambos casos, los extractos secos se disolvieron en piridina, se añadió el mismo volumen de Syton BTZ, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min para completar la reacción de silanización<sup>26</sup>. Las muestras fueron analizadas por cromatografía de gases en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890, equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice fundida con un 100% de dimetilsiloxano (25 m × 0,25 mm de diámetro interno) (Chrom-pack, Middelburg, Holanda). Las áreas de los picos se determinaron mediante el sistema informático Hewlett-Packard Chemstation, y la relación entre las áreas de colesterol/colestanol se usó para el cálculo de la masa de colesterol respecto a una curva estándar. Los resultados se expresaron en µg de colesterol/mg de proteína celular, y la masa de colesterol esterificado se calculó en función de la diferencia entre el contenido en colesterol total y el libre.

### Análisis estadístico

Los resultados corresponden a la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon mediante el test ANOVA combinado con el test de Student-Newman-Keuls, utilizando el programa informático GraphPad Instat.

## Resultados

### Efecto de avasimibe sobre el contenido intracelular de colesterol

El tratamiento de macrófagos THP-1 con LDL acetiladas (150 µg/ml de medio) durante 48 h produ-

**Tabla 1. Efecto de avasimibe sobre el contenido intracelular de colesterol en el modelo de incubación secuencial**

	CE	CL	CT
Control	19,40 ± 1,91	36,17 ± 1,97	55,57 ± 3,39
Avasimibe 0,02 µM	19,69 ± 2,50	35,18 ± 3,35	54,47 ± 4,60
Avasimibe 0,1 µM	18,40 ± 0,71	34,97 ± 1,65	53,37 ± 1,48
Avasimibe 0,2 µM	19,28 ± 0,97	35,55 ± 1,65	54,82 ± 2,53

Los macrófagos THP-1 se trataron con 150 mg/ml de LDL acetiladas durante 48 h. Seguidamente, se incubaron las células con avasimibe durante 48 h más, en presencia de 200 mg/ml de HDL en el medio de cultivo. A partir del lisado celular se extrajeron los lípidos y se determinaron los contenidos intracelulares de colesterol, tal como se indica en el apartado de "Material y métodos". Los resultados se expresan en mg de colesterol/mg de proteína celular, y corresponden a la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

jo un marcado incremento en el contenido intracelular de ésteres de colesterol ( $2,08 \pm 1,38$  a  $23,40 \pm 5,00$  µg/mg de proteína). Al mismo tiempo, se observaron cambios en la morfología celular típicos de la formación de células espumosas, con la presencia de múltiples gotículas lipídicas en el citosol, como se pudo corroborar mediante una tinción con Oil Red O.

Cuando los macrófagos cargados de lípidos se incubaron con avasimibe (0-0,2 µM) durante 48 h, en presencia de 200 µg/ml de HDL en el medio de cultivo, el contenido en colesterol esterificado (CE) no se modificó de forma significativa (tabla 1). Por el contrario, en macrófagos incubados simultáneamente con 150 µg/ml de acetil-LDL y avasimibe durante 48 h, se produjo una disminución dependiente de la concentración en el contenido intracelular de ésteres de colesterol (62 y 70% [ $p < 0,05$ ] a 0,1 y 0,2 µM, respectivamente). El colesterol total (CT) disminuyó a consecuencia de la reducción del CE. Sin embargo, a pesar de la ausencia de HDL en el medio de cultivo, el colesterol libre (CL) intracelular no resultó incrementado (fig. 2).

A continuación se investigó el efecto de avasimibe utilizando el mismo modelo, pero en presencia de un aceptor extracelular de colesterol, HDL

(200 µg/ml). A igualdad de concentración de avasimibe, el efecto sobre el contenido de CE resultó ser cuantitativamente menor. Así, a la concentración de 0,1 µM, avasimibe redujo un 62% el contenido celular en CE en ausencia de HDL, mientras que en presencia de HDL, la reducción fue sólo del 23%, llegando al 54% a la concentración de 0,75 µM ( $p < 0,01$ ) (fig. 3). Al igual que en el caso anterior, el CT disminuyó, sin detectarse acumulación de CL en la célula.

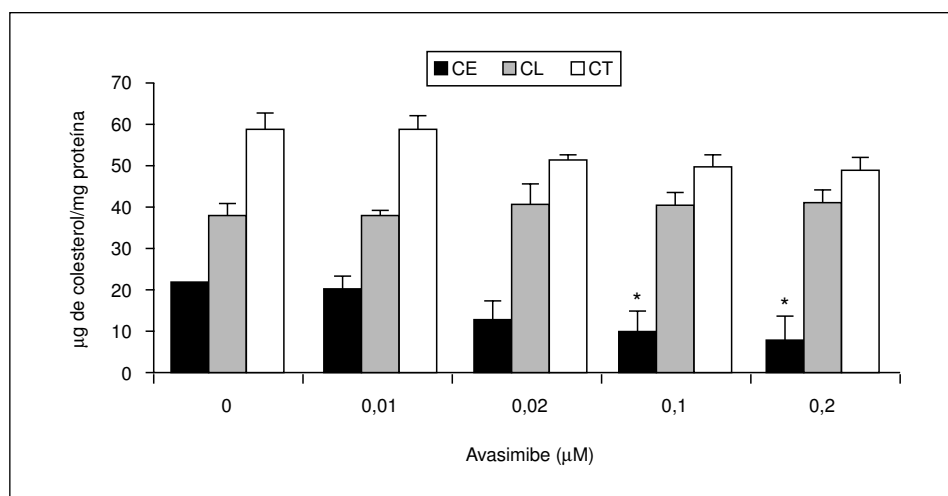
#### *Efecto de atorvastatina en el contenido intracelular de colesterol*

El tratamiento con atorvastatina no produjo reducciones en el contenido intracelular de CE ni de CT en el modelo de incubación simultánea, al menos en el rango de concentraciones ensayadas (0-5 µM). En cambio, cuando el fármaco se incluyó en el medio de cultivo 24 h antes de la exposición a acetil-LDL, el contenido intracelular de CE se redujo alrededor del 30-40% ( $p < 0,05$ ) (tabla 2).

#### *Combinación de avasimibe y atorvastatina*

El tratamiento de macrófagos con una combinación de avasimibe (0,2 y 0,5 µM) y atorvastatina

Figura 2. Efecto de avasimibe sobre el contenido intracelular de colesterol en el modelo de incubación simultánea, en ausencia de HDL en el medio de cultivo. Los macrófagos THP-1 se trataron simultáneamente con avasimibe y 150 mg/ml de acetil-LDL durante 48 h. Los resultados se expresan en mg de colesterol/mg de proteína celular, y corresponden a la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \* $p < 0,05$  (ANOVA).



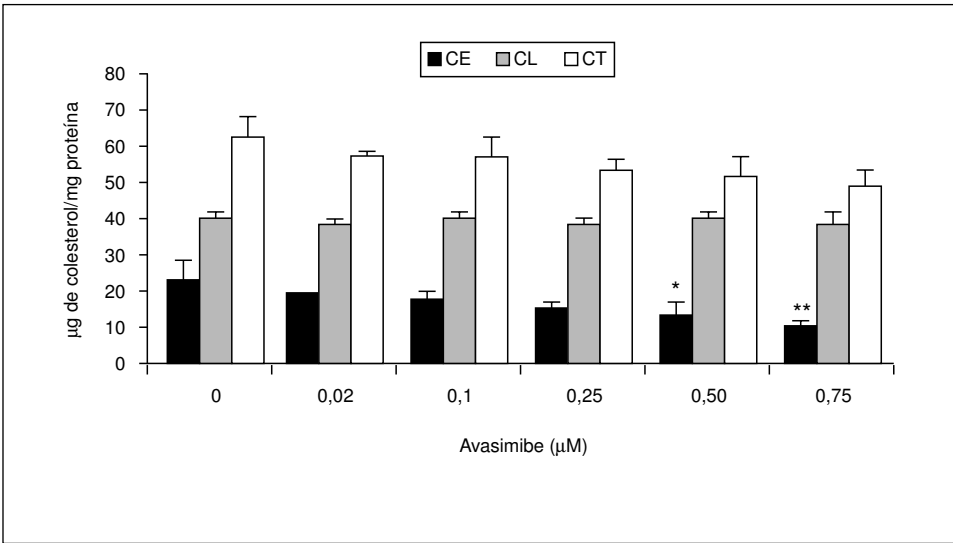


Figura 3. Efecto de avasimibe sobre el contenido intracelular de colesterol en el modelo de incubación simultánea en presencia de HDL en el medio de cultivo. Los macrófagos THP-1 se trataron simultáneamente con avasimibe, 150 mg/ml de acetil-LDL y 200 mg/ml de HDL durante 48 h. Los resultados se expresan en mg de colesterol/mg de proteína celular, y corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$  (ANOVA).

(5  $\mu$ M) produce una mayor disminución en el contenido intracelular de CE que el tratamiento con avasimibe solo. Así, en la figura 4 se observa que avasimibe 0,5  $\mu$ M redujo un 20% la masa de CE, mientras que la combinación de avasimibe 0,5  $\mu$ M y atorvastatina 5  $\mu$ M causó una reducción del 39%. La inclusión de mevalonato (200  $\mu$ M) o de geranilgeraniol (10  $\mu$ M) en el medio de cultivo, consiguió revertir el efecto de atorvastatina, obteniéndose porcentajes de reducción del contenido intracelular de CE similares a los que produjo el tratamiento con avasimibe solo (fig. 5).

Discusión

En el presente estudio se ha comprobado que el nuevo inhibidor de la ACAT avasimibe, también conocido como CI-1011<sup>27</sup>, es capaz de reducir el contenido de CE en macrófagos humanos sin incrementar el CL intracelular, y que dicho efecto

resulta potenciado por el inhibidor de la HMG-CoA reductasa, atorvastatina.

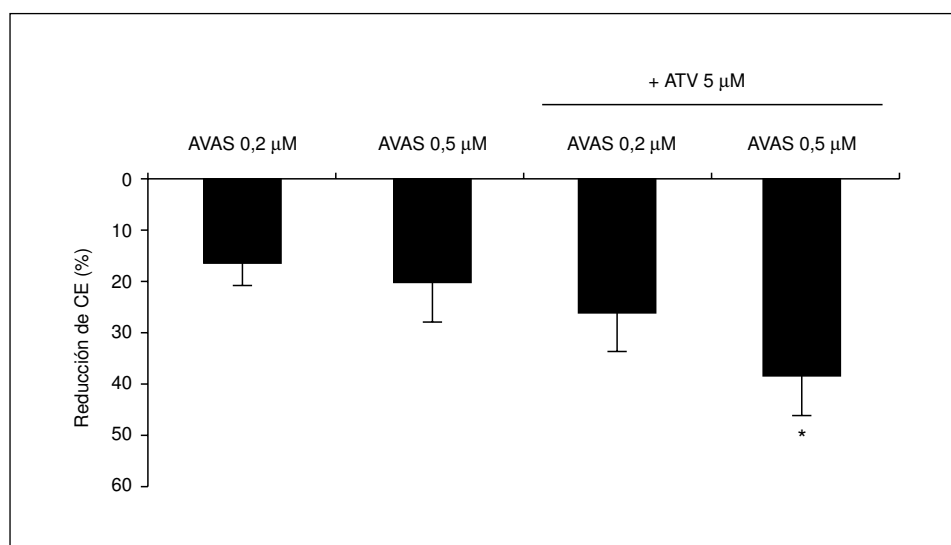
El efecto de avasimibe resultó ser diferente en función del modelo de incubación utilizado; así, el tratamiento con este fármaco no produjo reducciones significativas en el contenido intracelular de CE en el modelo de incubación secuencial (tabla 1). La ausencia de efecto de avasimibe en células espumosas, en las que el colesterol ya ha sido almacenado en forma de ésteres de colesterol antes de la exposición al fármaco, se ha descrito también para otros inhibidores de la ACAT<sup>22,28</sup>. Dichos resultados parecen apuntar a una falta de eficacia de estos fármacos como promotores de la regresión de una lesión aterosclerótica ya establecida<sup>22</sup>; sin embargo, diversos estudios<sup>10,29,30</sup> han demostrado que los inhibidores de la ACAT pueden inducir la regresión de lesiones en animales de experimentación. Parece ser que este efecto estaría relacionado con cambios en la

Tabla 2. Efecto de atorvastatina sobre el contenido intracelular de colesterol en el modelo de incubación simultánea

	CE	CL	CT
- HDL			
Control	22,54 $\pm$ 6,44	41,77 $\pm$ 0,81	64,31 $\pm$ 6,27
Atorvastatina 2,5 $\mu$ M	14,00 $\pm$ 2,24*	37,86 $\pm$ 0,98	51,85 $\pm$ 1,82
Atorvastatina 5 $\mu$ M	12,56 $\pm$ 2,01*	41,13 $\pm$ 2,24	53,69 $\pm$ 4,22
+ HDL			
Control	29,10 $\pm$ 3,81	45,71 $\pm$ 4,87	74,81 $\pm$ 8,59
Atorvastatina 2,5 $\mu$ M	22,10 $\pm$ 1,81*	51,12 $\pm$ 1,79	73,22 $\pm$ 0,26
Atorvastatina 5 $\mu$ M	20,00 $\pm$ 2,66*	48,54 $\pm$ 6,16	68,55 $\pm$ 8,64

Los macrófagos THP-1 se incubaron de forma simultánea durante 48 h con 150  $\mu$ g/ml de LDL acetiladas y atorvastatina en presencia o ausencia de 200  $\mu$ g/ml de HDL, previa incubación con atorvastatina durante 24 h. A partir del lisado celular se extrajeron los lípidos y se determinaron los contenidos intracelulares de colesterol, tal como se indica en el apartado de "Material y métodos". Los resultados se expresan en mg de colesterol/mg de proteína celular, y corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \* $p < 0,05$  (ANOVA).

Figura 4. Porcentajes de reducción del contenido intracelular de colesterol esterificado (CE) en macrófagos THP-1 tratados simultáneamente con 150 mg/ml de acetil-LDL y avasimibe (AVAS), solo o en combinación con atorvastatina (ATV) 5  $\mu$ M, en presencia de 200 mg/ml de HDL durante 48 h. Los resultados se expresan en porcentajes de reducción del contenido intracelular en CE respecto a los macrófagos incubados con acetil-LDL y HDL ( $32,05 \pm 14,66$  mg/mg de proteína;  $n = 4$ ). \* $p < 0,05$  frente a AVAS 0,5  $\mu$ M; \* $p < 0,05$  frente a AVAS 0,2  $\mu$ M (ANOVA).



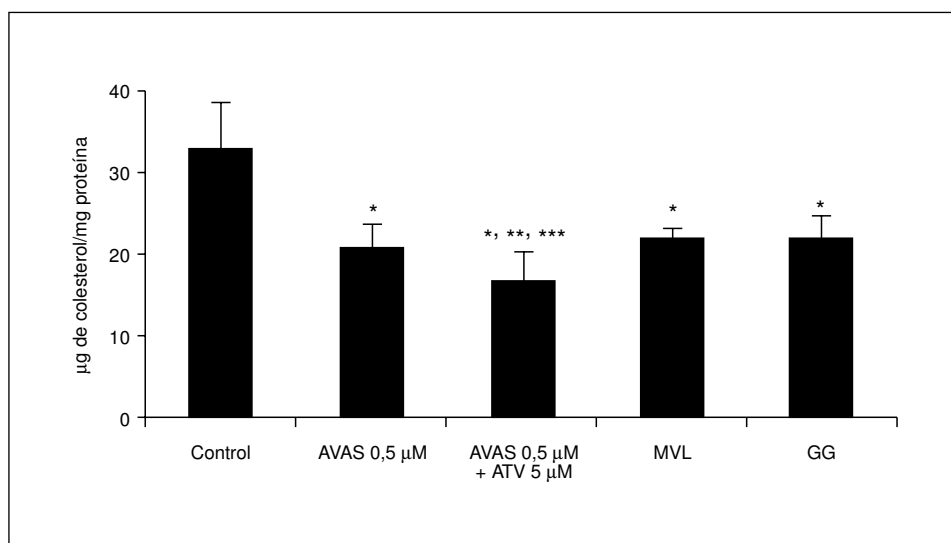
expresión local de moléculas proaterogénicas, y no con la alteración de la composición lipídica de la lesión<sup>10</sup>.

En el modelo de incubación simultánea, el efecto de avasimibe fue totalmente diferente; así, en ausencia de un aceptor extracelular de cHDL en el medio de cultivo, avasimibe fue capaz de prevenir la acumulación de CE (fig. 2). A pesar de la ausencia de HDL, la disminución del contenido en CE no estuvo acompañada de un incremento del CL intracelular. En contraste con nuestros resultados, la incubación de macrófagos de roedores<sup>22,31,32</sup>, células THP-1<sup>28</sup> o macrófagos derivados de monocitos humanos<sup>33</sup>, con otros inhibidores de la ACAT en ausencia de aceptores extracelulares de colesterol produjo incrementos significativos en los valores

de CL intracelular. La acumulación de colesterol no esterificado en macrófagos tratados con inhibidores de la ACAT resulta altamente citotóxica tanto in vitro<sup>31,32,34</sup> como in vivo<sup>35</sup>. Además, ratones deficientes en receptor LDL, cuyos macrófagos no expresan ACAT-1, presentan acumulación de CL en la pared arterial, lo que conduce a una aceleración en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas<sup>36</sup>. Así, el hecho de que en nuestro estudio no se haya detectado acumulación de CL, a pesar del alto grado de inhibición de la ACAT, parece apuntar a un mejor perfil de seguridad para avasimibe. Ello concuerda con la falta de efectos adversos demostrada por este fármaco en un reciente estudio clínico<sup>37</sup>.

Cuando se añadió HDL como aceptor extracelular de colesterol en el modelo de incubación simultánea,

Figura 5. Efecto de mevalonato (MVL) y geranilgeraniol (GG) sobre el contenido intracelular de ésteres de colesterol (CE) en macrófagos THP-1 tratados con 150 mg/ml de acetil-LDL y avasimibe (AVAS) 0,5  $\mu$ M,  $\pm$  atorvastatina (ATV) 5  $\mu$ M en presencia de HDL durante 48 h. Los resultados se expresan en mg de colesterol/mg de proteína celular, y corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. \* $p < 0,001$  respecto a control. \*\* $p < 0,05$  respecto a AVAS 0,5  $\mu$ M. \*\*\* $p < 0,05$  respecto a MVL y GG.



nea, el efecto de avasimibe resultó reducido, en comparación con los resultados obtenidos en ausencia de HDL (figs. 2 y 3). Esto puede explicarse teniendo en cuenta la alta lipofilia de la mayoría de los inhibidores de la ACAT<sup>38</sup>. Así, se ha descrito que en el ensayo de actividad ACAT, la IC<sub>50</sub> para avasimibe disminuye cuando la concentración microsomal se reduce, y que la adición de lípidos al medio de incubación restituye dicho valor<sup>27</sup>. En nuestros experimentos, la adición de 200 µg/ml de HDL incrementa notablemente la cantidad de lípidos presentes en el medio de cultivo, con lo que probablemente se reduce la cantidad de fármaco disponible para inhibir la ACAT.

Varios autores<sup>10,14,15</sup> han demostrado que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa y de la ACAT actúan sinérgicamente, reduciendo el área de la lesión aterosclerótica en diversos modelos animales. Por ello, resulta interesante estudiar los efectos de una combinación de avasimibe y atorvastatina en nuestro modelo in vitro de macrófagos humanos.

En primer lugar, se estudió el efecto de atorvastatina utilizando el mismo protocolo de incubación simultánea usado para avasimibe. En estas condiciones, el contenido intracelular de colesterol esterificado no resultó modificado significativamente. Este resultado puede atribuirse al hecho de que la estatina fue añadida al mismo tiempo que las acetil-LDL, cuya captación causa por sí misma una reducción significativa de la actividad HMG-CoA reductasa<sup>39</sup>. Por ello, se decidió preincubar las células con atorvastatina durante 24 h antes de la adición de acetil-LDL, obteniéndose una disminución significativa (30-40%) en los valores de CE intracelular (tabla 2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en macrófagos murinos, en los que diversas estatinas inhiben la esterificación de colesterol inducida por las acetil-LDL<sup>12,40,41</sup>.

La combinación de avasimibe y atorvastatina resultó ser más efectiva que avasimibe solo, en cuanto a la reducción de la acumulación de CE intracelular; concretamente, la adición de 5 µM de atorvastatina potenció alrededor de dos veces ( $p < 0,05$ ) el efecto de 0,5 µM de avasimibe (fig. 4). Los efectos aditivos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa y la ACAT han sido atribuidos a su acción sobre diferentes tipos celulares de la pared arterial: las estatinas parecen actuar principalmente sobre las células musculares lisas, mientras que la inhibición de la ACAT reduciría la participación de monocitos-macrófagos<sup>10</sup>. Sin embargo, nuestros resultados nos llevan a

pensar que los dos fármacos actúan sinérgicamente en el macrófago. Así, la clara reducción del contenido en ésteres de colesterol en la aorta torácica obtenida con la terapia combinada en los modelos in vivo<sup>10,14</sup> podría ser atribuida, de acuerdo con nuestros resultados, a una mayor disminución del contenido en CE de los macrófagos de dicha área.

El mecanismo por el cual atorvastatina potencia el efecto de avasimibe parece estar relacionado con la inhibición de la HMG-CoA reductasa y la depleción de algunos derivados de mevalonato, ya que la adición de mevalonato y geranil-geraniol anuló este efecto (fig. 5). Según Cignarella et al<sup>42</sup>, el proceso de esterificación del colesterol en el macrófago depende del transporte del CL hacia la membrana, paso previo para que éste sea esterificado por la ACAT. Parece ser que este transporte se realiza mediante proteínas que, para funcionar correctamente, requieren estar acopladas a unidades isoprenoídes. Probablemente, estas proteínas requieran ser geranil-geraniladas, ya que Bernini et al<sup>40,41</sup> demostraron que la reducción de la esterificación de colesterol en el macrófago es revertida por adición de geranil-geraniol, pero no de farnesol, otro intermediario de tipo isoprenoide.

Por otro lado, a pesar de que el tratamiento con estatinas no modifica de forma directa la actividad ACAT en modelos animales<sup>43,44</sup>, es bien conocido que sí puede afectarla de forma indirecta, limitando la disponibilidad de sustrato para la reacción de esterificación<sup>14</sup>. Esto explicaría el mayor efecto de avasimibe sobre una enzima ya inhibida por la previa adición de atorvastatina.

En conclusión, en este estudio se demuestra cómo el nuevo inhibidor de la ACAT, avasimibe, reduce la acumulación de CE en macrófagos humanos THP-1 expuestos simultáneamente a acetil-LDL, pero no en macrófagos ya cargados de lípidos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bocan et al<sup>10</sup>, donde se sugiere que la inhibición de la acumulación de CE en macrófagos arteriales es uno de los mecanismos por los que avasimibe retarda la progresión de la lesión. La reducción del CE no estuvo acompañada de un incremento en los valores intracelulares de CL, lo que apunta a un mejor perfil de seguridad para avasimibe. Además, se demuestra cómo avasimibe y atorvastatina actúan sinérgicamente reduciendo la acumulación de CE en el macrófago; esto podría traducirse, en el caso de la terapia combinada con dichos fármacos, en una mayor reducción del contenido lipídico de los macrófagos presentes en el área de lesión ateromatosa.

## Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a F. Guardiola, por su ayuda con las técnicas de GLC, y a J. Ribalta y J. Girona, de la Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi (Dr. L. Massana), Universitat Rovira i Virgili, por las células THP-1. Este estudio fue parcialmente subvencionado por Pfizer S.A. (proyecto 1011-421-01), Beca de la Fundación Española de Arteriosclerosis (1999), FPCNL, CICYT (SAF00-0201), FISS (00/1124 and 01/0075-01). Gemma Llaверías es becario de la Fundación Universitaria Agustí Pedro i Pons de la Universidad de Barcelona.

## Bibliografía

- Roth BD. ACAT-inhibitors: evolution from cholesterol-absorption inhibitors to antiatherosclerotic agents. *Drug Discovery Today* 1998;3:19-25.
- Kusunoki J, Hansoty DK, Aragane K, Fallon JT, Badimon JJ, Fisher EA. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibition reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001;103:2604-9.
- Doshi R, Wu J, Fischelevich R, Rodríguez A. Update on the role of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitors in atherosclerosis. *Expert Opin Ther Patents* 2001;11:1655-62.
- Chang TY, Chang CC, Cheng D. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem* 1997;66:613-38.
- Buhman KF, Accad M, Farese RV. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:142-54.
- Miyazaki A, Sakashita N, Lee O, Takahashi K, Horiuchi S, Hakamata H, et al. Expression of ACAT-1 protein in human atherosclerotic lesions and cultured human monocytes-macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1568-74.
- Ishii I, Yokoyama N, Yanagimachi M, Ashikawa N, Hata M, Murakami S, et al. Stimulation of cholesterol release from rabbit foam cells by the action of a new inhibitor for acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT), HL-004. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:115-21.
- Ohgami N, Kuniyasu A, Furukawa K, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, et al. Glibenclamide acts as an inhibitor of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:417-22.
- Sliskovic DR, White AD. Therapeutic potential of ACAT inhibitors as lipid lowering and anti-atherosclerotic agents. *Trends Pharmacol Sci* 1991;12:194-9.
- Bocan TM, Krause BR, Rosebury WS, Lu X, Dagle C, Bak Mueller S, et al. The combined effect of inhibiting both ACAT and HMG-CoA reductase may directly induce atherosclerotic lesion regression. *Atherosclerosis* 2001;157:97-105.
- Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000;101:207-13.
- Corsini A, Bernini F, Quarato P, Donetti E, Bellosa S, Fumagalli R, et al. Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology* 1996;87:458-68.
- Davignon J, Laaksonen R. Low-density lipoprotein-independent effects of statins. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:543-59.
- Bocan TM, Mueller SB, Brown EQ, Lee P, Bocan MJ, Rea T, et al. HMG-CoA reductase and ACAT inhibitors act synergistically to lower plasma cholesterol and limit atherosclerotic lesion development in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* 1998;139:21-30.
- Junquero D, Bruniquel F, N'Guyen X, Autin JM, Patoiseau JF, Degryse AD, et al. F 12511, a novel ACAT inhibitor, and atorvastatin regulate endogenous hypercholesterolemia in a synergistic manner in New Zealand rabbits fed a casein-enriched diet. *Atherosclerosis* 2001;155:131-42.
- Mills GL, Lane PA, Weech PK. The isolation and purification of plasma lipoproteins. En: Mills GL, Lane PA, Weech PK, editors. *A guidebook to lipoprotein technique*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984; p. 25-50.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 1976;72:248-54.
- Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3178-82.
- Colli S, Eligini S, Lalli M, Camera M, Paoletti R, Tremoli E. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:265-72.
- McCrohon JA, Nakhla S, Jessup W, Stanley KK, Celermajer DS. Estrogen and progesterone reduce lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages: a sex-specific effect. *Circulation* 1999;100:2319-25.
- Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991;47:22-31.
- Hakamata H, Miyazaki A, Sakai M, Sakamoto YI, Matsuda H, Kihara K, et al. Differential effects of an acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor on HDL-induced cholesterol efflux from rat macrophage foam cells. *FEBS Lett* 1995;363:29-32.
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65:55-63.
- Ravandi A, Kuksis A, Shaikh NA. Glycated phosphatidylethanolamine promotes macrophage uptake of low density lipoprotein and accumulation of cholesteryl esters and triacylglycerols. *J Biol Chem* 1999;274:16494-500.
- Klansek JJ, Yancey P, St Clair RW, Fischer RT, Johnson WJ, Glick JM. Cholesterol quantitation by GLC: artifactual formation of short-chain steryl esters. *J Lipid Res* 1995;36:2261-6.
- Guardiola F, Codony R, Rafecas M, Boatella J. Selective gas chromatographic determination of cholesterol in eggs. *J Am Oil Chem Soc* 1994;71:867-71.
- Lee HT, Sliskovic DR, Picard JA, Roth BD, Wierenga W, Hicks JL, et al. Inhibitors of acyl-CoA: cholesterol O-acyl transferase (ACAT) as hypocholesterolemic agents. CI-1011: an acyl sulfamate with unique cholesterol-lowering activity in animals fed noncholesterol-supplemented diets. *J Med Chem* 1996;39:5031-4.
- Azuma Y, Kawasaki T, Ikemoto K, Ohno K, Yamada T, Yamasaki M, et al. Effects of NTE-122, a novel acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, on cholesterol esterification and high-density lipoprotein-induced cholesterol efflux in macrophages. *Jpn J Pharmacol* 1999;79:159-67.
- Bocan TM, Mueller SB, Uhlendorf PD, Newton RS, Krause BR. Comparison of CI-976, an ACAT inhibitor, and selected lipid-lowering agents for antiatherosclerotic activity in iliac-femoral and thoracic aortic lesions. A biochemical, morphological, and morphometric evaluation. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1830-43.
- Bocan TM, Mueller SB, Uhlendorf PD, Brown EQ, Mazur MJ, Black AE. Inhibition of acyl-CoA cholesterol O-acyltransferase reduces the cholesteryl ester enrichment of atherosclerotic lesions in the Yucatan micropig. *Atherosclerosis* 1993;99:175-86.
- Warner GJ, Stoudt G, Bamberger M, Johnson WJ, Rothblat GH. Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. *J Biol Chem* 1995;270:5772-8.
- Kellner-Weibel G, Geng YJ, Rothblat GH. Cytotoxic cholesterol is generated by the hydrolysis of cytoplasmatic cholesteryl ester and transported to the plasma membrane. *Atherosclerosis* 1999;146:309-19.
- Rodríguez A, Bachorik PS, Wee SB. Novel effects of the acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor 58-035 on foam cell development in primary human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2199-206.
- Kellner-Weibel G, Jerome WG, Small DM, Warner GJ, Stoltzberg JK, Kearney MA, et al. Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:423-31.
- Perrey S, Legendre C, Matsuura A, Guffroy C, Binet J, Ohbayashi S, et al. Preferential pharmacological inhibition of macrophage ACAT increases plaque formation in mouse and rabbit models of atherogenesis. *Atherosclerosis* 2001;155:359-70.
- Fazio S, Major AS, Swift LL, Gleaves LA, Accad M, Linton MF, et al. Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT1 in macrophages. *J Clin Invest* 2001;107:163-71.



37. Insull W Jr, Koren M, Davignon J, Sprecher D, Schrott H, Keilson LM, et al. Efficacy and short-term safety of a new ACAT inhibitor, avasimibe, on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins, in patients with combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2001;157:137-44.
38. Homan R, Hamelhele KL. Influence of membrane partitioning on inhibitors of membrane-bound enzymes. *J Pharm Sci* 2001; 90:1859-67.
39. Knight BL, Patel DD, Soutar AK. The regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity, cholesterol esterification and the expression of low-density lipoprotein receptors in cultured monocyte-derived macrophages. *Biochem J* 1983;15:210:523-32.
40. Bernini F, Didoni G, Bonfadini G, Bellosta S, Fumagalli R. Requirement for mevalonate in acetylated LDL induction of cholesterol esterification in macrophages. *Atherosclerosis* 1993;104:19-26.
41. Bernini F, Scurati N, Bonfadini G, Fumagalli R. HMG-CoA reductase inhibitors reduce acetyl LDL endocytosis in mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1352-8.
42. Cignarella A, Brennhäusen B, Von Eckardstein A, Assmann G, Cullen P. Differential effects of lovastatin on the trafficking of endogenous and lipoprotein-derived cholesterol in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18: 1322-9.
43. Alegret M, Verd JC, Díaz C, Hernández G, Adzet T, Sánchez RM, et al. Effect of hypolipidemic drugs on key enzyme activities related to lipid metabolism in normolipidemic rabbits. *Eur J Pharmacol* 1998;347:283-91.
44. Verd JC, Peris C, Alegret M, Díaz C, Hernández G, Vázquez M, et al. Different effect of simvastatin and atorvastatin on key enzymes involved in VLDL synthesis and catabolism in high fat/cholesterol fed rabbits. *Br J Pharmacol* 1999;127:1479-85.