

Efecto de los agonistas PPAR sobre los valores de ARNm de genes implicados en el metabolismo lipídico de macrófagos humanos

A. Cabrero, M. Cubero, G. Llaverías, M. Jové, A. Planavila y M. Vázquez-Carrera

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

Fundamento. Los receptores activados por proliferadores peroxisómicos (*peroxisome proliferator-activated receptors* [PPAR]) desempeñan un papel fundamental en el control del metabolismo lipídico de los macrófagos. El objetivo del presente estudio ha sido determinar los efectos de 3 activadores de PPAR (bezafibrato, fenofibrato y troglitazona) sobre las concentraciones de ARNm de genes implicados en el metabolismo lipídico de macrófagos humanos y células espumosas.

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 lipoproteínas de baja densidad acetiladas (150 µg/ml) durante 48 h. Los valores de ARNm se determinaron mediante reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-PCR). Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar de 3 experimentos.

Resultados. Los macrófagos humanos tratados durante 24 h con bezafibrato 100 µM, un fármaco que activa los 3 subtipos de PPAR (α , β/δ y γ), mostraron un incremento en los valores de ARNm de CD36 y aP2

del 87% ($p < 0,01$) y el 230%, respectivamente, mientras que las expresiones de PPAR γ , PPAR α , acil-CoA oxidasa, carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I), *ATP-binding cassette transporter 1* (ABCA1), colesteryl éster hidrolasa neutra y *lectin-like oxidized low density receptor-1* (LOX-1) no resultaron modificadas. Por el contrario, el tratamiento con agonistas selectivos PPAR α (100 µM de fenofibrato) y γ (5 µM de troglitazona) provocó diferentes efectos. El fenofibrato incrementó los valores de ARNm de PPAR α (el 62%; $p < 0,05$) y LOX-1 (el 180%; $p < 0,05$), mientras que la troglitazona aumentó la expresión de CPT-I (el 75%; $p < 0,05$). Cuando se estudió el efecto de estos fármacos en las células espumosas derivadas de macrófagos, se observó que la troglitazona incrementaba un 134% ($p < 0,05$) y un 66% ($p < 0,01$) los valores de ARNm de ABCA1 y CPT-I, respectivamente, mientras que los 3 fármacos estudiados incrementaron de forma significativa los valores de aP2 (aproximadamente, un 100%). Puesto que la troglitazona incrementaba la expresión de genes implicados en la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos (CPT-I), así como en el transporte reverso de colesterol (ABCA1), se determinó si estos cambios afectaban a la acumulación intracelular de ésteres de colesterol. En células espumosas derivadas de macrófagos se observó una reducción (el 32%; $p < 0,01$) en la acumulación intracelular de colesterol tras el tratamiento con troglitazona, pero no tras el tratamiento con bezafibrato o fenofibrato.

Conclusión. Se necesitan estudios complementarios para establecer si la inducción en la expresión de CPT-I por la troglitazona reduce la disponibilidad de ácidos grasos necesarios para la síntesis de ésteres de colesterol y la formación de las células espumosas.

Palabras clave:

Troglitazona. Macrófagos. Células espumosas. CPT-I. ABCA1.

Este estudio ha sido realizado gracias a la concesión de la beca de la Fundación Española de Arteriosclerosis 2002.

Correspondencia: Dr. M. Vázquez Carrera.
Unitat de Farmacologia. Facultat de Farmàcia.
Universitat de Barcelona.
Avda. Diagonal, 643. 08028 Barcelona. España.
Correo electrónico: mvazquezcarrera@ub.edu

Recibido el 25 de febrero de 2003 y aceptado el 23 de junio de 2003.

PPAR AGONIST EFFECTS ON mRNA LEVELS OF GENES INVOLVED IN LIPID METABOLISM IN HUMAN MACROPHAGES

Background and aim. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are key regulators of macrophage lipid metabolism. The aim of this study was to compare the effects of three PPAR activators (bezafibrate, fenofibrate and troglitazone) on mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in human macrophages and foam cells.

Material and methods. Human monocytes were isolated by gradient-density centrifugation from buffy coats of human donors. Mononuclear cells were then incubated with heat-inactivated human serum, and on day 10 completely differentiated to macrophages. Differentiated macrophages were then lipid-loaded during a 48-hour incubation with 150 µg/mL acetyl-LDL. Relative levels of specific mRNAs were assessed by RT-PCR. Results are expressed as mean ± standard deviation of 3 experiments.

Results. Treatment of human macrophages for 24 hours with 100 µM bezafibrate, a non-selective drug that activates the three PPAR subtypes (PPARα, PPARβ/δ and PPARγ), produced 87% (p < 0.01) and 230% rises in CD36 and aP2 mRNA levels, respectively, whereas expressions of PPARγ, PPARα, acyl-CoA oxidase, carnitine palmitoyltransferase I (CPT-I), ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1), neutral cholesteryl ester hydrolase, and lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) were not modified. However, treatment with selective PPARα (fenofibrate at 100 µM) and PPARγ (troglitazone at 5 µM) activators had different effects. Fenofibrate increased PPARα (62%; p < 0.05) and LOX-1 (180%; p < 0.05) mRNA levels, whereas troglitazone up-regulated CPT-I expression (75%; p < 0.05). When the effects of these 3 drugs were assessed in macrophage-derived foam cells, troglitazone caused rise a 134% (p < 0.05) and a 66% (p < 0.01) rises in ABCA1 and CPT-I mRNA levels, respectively, whereas the three drugs significantly increased aP2 transcripts (approx. 100% induction). Given that troglitazone treatment resulted in the up-regulation of genes involved in the mitochondrial β-oxidation of fatty acids (CPT-I) and in the reverse cholesterol transport pathway (ABCA1), we subsequently determined whether these changes affected intracellular cholesterol ester accumulation. In macrophage-derived foam cells, a significant reduction (32%; p < 0.01) was

observed in intracellular cholesterol accumulation after troglitazone, but not after bezafibrate or fenofibrate treatment.

Conclusion. Further studies are required to ascertain whether CPT-I induction by troglitazone reduces the availability of fatty acids for synthesizing cholesterol esters, thereby leading to less foam cell formation.

Key words:

Troglitazone. Macrophages. Foam cells. CPT-I. ABCA1.

Introducción

La formación de las células espumosas es un proceso clave en el desarrollo del proceso aterosclerótico¹. Estas células se forman como consecuencia de una desregulación de la captación de lipoproteínas modificadas por los receptores *scavenger*, lo que da lugar a la acumulación de ésteres de colesterol en su citoplasma. En el interior de los macrófagos los ésteres de colesterol se encuentran en equilibrio dinámico con el colesterol libre, por lo que sufren hidrólisis continuas y reesterificaciones. El colesterol libre puede migrar hacia la membrana plasmática, donde es transferido por el *ATP-binding cassette transporter 1* (ABCA1) a un aceptor de colesterol (p. ej., la apolipoproteína [Apo] A-I), y dar lugar a una secreción neta de colesterol. Además, los mismos macrófagos pueden facilitar la salida de colesterol a través de la secreción de Apo E, que actúa como un aceptor del colesterol libre en macrófagos humanos².

Los receptores activados por proliferadores peroxisómicos (*peroxisome proliferator-activated receptors* [PPAR]) son receptores nucleares que regulan el metabolismo de los lípidos y de la glucosa³, y están implicados en los procesos que conducen al desarrollo de la aterosclerosis. El subtipo PPARα (NR1C1) se expresa en células de la pared arterial (macrófagos, células musculares lisas y células endoteliales), el hígado, el corazón, el músculo esquelético y el riñón, y es activado por fibratos (fenofibrato, bezafibrato, gemfibrozilo), ácidos grasos y eicosanoides. El PPARδ/β (NR1C2) se expresa en muchos tejidos, y en la actualidad no existen fármacos comercializados selectivos de este receptor. El PPARγ (NR1C3), además de expresarse en el tejido adiposo, está presente en macrófagos y es activado por las tiazolidindionas (troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona) y los ácidos grasos. La activación de PPARα y PPARγ en macrófagos provoca una regulación transcripcional de genes implicados en el metabolismo lipídico

co y puede influir en el desarrollo y la evolución de aterosclerosis. Así, por ejemplo, la activación de PPAR γ provoca la inducción transcripcional de la expresión de CD36 en macrófagos⁴, aunque este efecto no se traduce en la acumulación intracelular de colesterol⁵. Por otro lado, la activación de PPAR α y γ también induce la expresión del gen que codifica para ABCA1, implicado en la vía del transporte reverso de colesterol y en el control de las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas de alta densidad (HDL), que son factores protectores contra la aterosclerosis⁵. Esta regulación de ABCA1 por los PPAR puede explicar, en parte, el efecto protector contra la aterosclerosis proporcionado tanto por los activadores de PPAR α (fibratos) como por los de PPAR γ (tiazolidindionas)^{6,7}. Por el contrario, el papel desempeñado por PPAR β en la formación de las células espumosas es más controvertido, puesto que existen estudios que demuestran que los agonistas de este receptor pueden incrementar⁸ o reducir⁹ la acumulación de lípidos en los macrófagos. En un intento por definir el papel de los PPAR en el metabolismo lipídico de los macrófagos en este estudio se han comparado los efectos de 3 activadores de PPAR (bezafibrato, fenofibrato y troglitazona) sobre los valores de ARNm de diferentes genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos y del colesterol, los 2 componentes de los ésteres de colesterol, en cultivo primario de macrófagos humanos y en células espumosas derivadas de macrófagos. En concreto, se han estudiado los efectos de estos fármacos sobre los valores de ARNm de genes implicados en la β -oxidación mitocondrial (carnitina palmitoil-transferasa [CPT-I]) y peroxisómica (acil-CoA oxidasa [ACO]) de los ácidos grasos y sobre aquellos implicados en la homeostasis del colesterol (colesteril éster hidrolasa neutra [nCEH] y ABCA1). Los activadores de los PPAR utilizados en este estudio modificaron de forma diferente la expresión de los genes estudiados. La troglitazona fue el único fármaco que incrementó de forma significativa la expresión de CPT-I y ABCA1, y disminuyó la acumulación intracelular de ésteres de colesterol en células espumosas en ausencia de un receptor de colesterol en el medio de cultivo. El aumento de la expresión de CPT-I causado por la troglitazona puede contribuir a reducir los valores de ésteres de colesterol, puesto que reduce la disponibilidad de ácidos grasos para la esterificación del colesterol. Esta reducción de la formación de ésteres de colesterol puede facilitar posteriormente la secreción de colesterol libre de los macrófagos a través de un proceso mediado por la Apo E¹⁰.

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 ácido etilendiaminotetracético (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), la banda de células mononucleares se aisló por aspiración y se lavó 3 veces con tampón fosfato salino estéril. El *pellet* de células mononucleares se resuspendió en el medio A (RPMI 1640 con L-glutamina y HEPES, 25 mM, suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, un 1% de L-glutamina, un 1% de aminoácidos no esenciales y un 2% de piruvato sódico; Invitrogen) y éstas se cultivaron 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 lavó la placa con tampón fosfato salino (con calcio y magnesio, y sin bicarbonato) y se incubaron 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, la cantidad de suero humano se redujo al 10%. Entre los días 10 y 11 los monocitos se diferenciaron completamente en macrófagos y se transformaron 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.

Los macrófagos y las células espumosas derivadas de macrófagos se trataron con 100 μ M de bezafibrato, 100 μ M de fenofibrato o 5 μ M de troglitazona durante 24 h. Después de la incubación, se realizó la extracción del ARN tal como se describe a continuación.

Lipoproteínas

Las LDL se obtuvieron mediante ultracentrifugación secuencial de suero humano¹¹ y se acetilaron siguiendo el método descrito por Basu et al¹². Las LDL acetiladas fueron concentradas (Centriplus, Millipore), y la concentración final de proteína se determinó por el método de Bradford. La correcta acetilación de las LDL se estableció por el aumento de, como mínimo, 2,5 veces en su movilidad electroforética relativa en gel de agarosa al 1%, respecto a las LDL nativas

Extracción y análisis de ácido ribonucleico

El ARN total se aisló mediante el reactivo Ultraspec (Biotech). Los valores relativos de ARNm se determinaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-PCR)¹³. 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 Tris-HCl, 50 mM (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de ditiotreitól, 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 de [³²P] dATP (3.000 Ci/mmol, Amersham), 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y 0,5 μ g de cada oligonucleótido específico

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

	Secuencias oligonucleótidos	Número de ciclos de amplificación		Tamaño del fragmento amplificado (pb)
		M ø	CE	
PPAR γ	Sentido: 5'-CATTCTGGCCACCAACTTTGG-3' Antisentido: 5'-TGGAGATGCAGGCTCCACTTTG-3'	25	25	229
CPT-I	Sentido: 5'-CAGGCCGTGGCCTTCCAGTTC-3' Antisentido: 5'-CCATGCTGAGAAGTGCCCGGG-3'	27	27	295
ACO	Sentido: 5'-GCCAGGTGAAGCCTGATGGA-3' Antisentido: 5'-GACTGGTGCCTCAGCGCTG-3'	35	35	161
CD36	Sentido: 5'-CTGTGACCGGAAGTGTGGGCT-3' Antisentido: 5'-GAAGATGGCACCATTGGGCTG-3'	18	23	361
ABCA1	Sentido: 5'-GGAGGCAATGGCACTGAGGAA-3' Antisentido: 5'-CCTGCCTTGTGGCTGCAGTGT-3'	23	21	181
PPAR α	Sentido: 5'-GGAAAGCCACTCTGCCCT-3' Antisentido: 5'-AGTCACCGAGGAGGGGCTCGA-3'	25	25	235
aP2	Sentido: 5'-TCCAGTGAAAACCTTTGATGATTAT-3' Antisentido: 5'-ACGCATTCCACCACAGTTTATCA-3'	18	21	319
nCEH	Sentido: 5'-CACAGCCTGTGGCCATTTTCC-3' Antisentido: 5'-CCTCCGTGGATCCACACCATC-3'	23	23	295
LOX-1	Sentido: 5'-ACTCTCCATGGTGGTGCCTGG-3' Antisentido: 5'-CATTAGCTCCGAGCAAGGG-3'	23	23	251
β -actina	Sentido: 5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3' Antisentido: 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGTAGG-3'	20	23	764

PPAR: receptores activados por proliferadores peroxisómicos; CPT-I: carnitina palmitoiltransferasa I; ACO: acil-CoA oxidasa; ABCA1: *ATP-binding cassette transporter 1*; aP2: proteína de unión a ácidos grasos adipocitaria; nCEH: colesterolil éster hidrolasa neutra; LOX-1: *lectin like oxidized low density receptor 1*.

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 el dNTP mediante una capa de parafina (los componentes de la reacción entraron en contacto con la temperatura de fusión de la parafina, 60 °C). La PCR se inició con una desnaturalización a 94 °C durante 1 min, seguida del ciclo de amplificación, consistente en una desnaturalización a 92 °C durante 1 min, una hibridación con los oligonucleótidos específicos a 60 °C durante 1 min y 15 s y una etapa de síntesis a 72 °C durante 1 min y 50 s. La reacción se terminó con 5 min de síntesis final a 72 °C. Un total de 5 μ l de la reacción de PCR se sometió a una electroforesis en gel de poli-acrilamida al 5% y los productos de la amplificación fueron visualizados mediante autorradiografía (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 se presentan en la tabla 1. Para cada uno de los genes amplificados se llevaron a cabo estudios preliminares de número de ciclos de amplificación y cantidad de ADN complementario que se debían amplificar para determinar las condiciones óptimas de trabajo (por debajo del límite de saturación). En estas condiciones, este método permite la cuantificación relativa del ARNm¹⁴. Las bandas radiactivas se cuantificaron por densitometría (Vilber 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).

Preparación de los extractos celulares y análisis del colesterol celular

Tras lavar las células 3 veces se recogieron en un volumen final de PBS de 1 ml y se sonicaron (Branson Sonifier) (3 \times 10 s a 25 W). Una alícuota de 0,2 ml del lisado se utilizó para la determinación

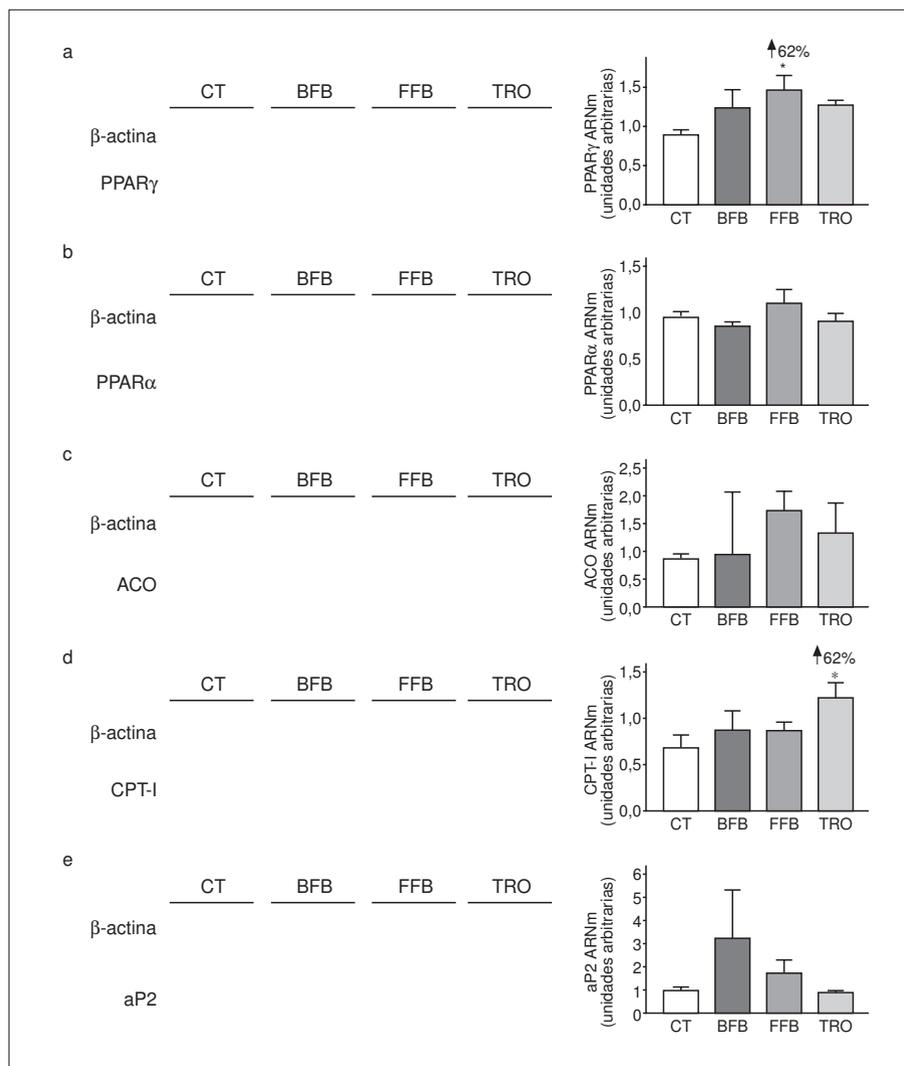
de proteína y el resto se dividió en 2 alícuotas a las que se añadió colestanol, y se procedió a extraer los lípidos con una solución de metanol/cloroformo 1:2 (v/v). El extracto de una de estas alícuotas fue saponificado según el método de Klasek et al¹⁵ y utilizado para determinar el colesterol total, mientras que el extracto no saponificado se empleó para la cuantificación del colesterol libre. Ambos extractos se secaron bajo corriente de N₂ y se redisolviaron en 25 μ l de piridina anhidra (Merck). A continuación, se añadieron 25 μ l de Sylon BTZ (Supelco), y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min para completar la reacción de silanización¹¹. Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890, equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice fundido (25 m \times 0,25 mm de diámetro interno) con fase estacionaria de dimetilpolisiloxano (CP-Sil 5 CB, Chrompack). Para cada muestra se determinó el área de la relación colesterol/colestanol, y la cantidad de colesterol se cuantificó a partir de una curva de calibración realizada con muestras con diferentes proporciones. Los resultados se expresan en microgramos de colesterol/miligramos de proteína celular, y los ésteres de colesterol se calcularon por diferencia a partir de los valores de colesterol total y colesterol libre.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de 3 experimentos. Las diferencias significativas se establecieron mediante ANOVA (Tukey-Kramer), utilizando el programa GraphPad InStat (GraphPad Software V 2.03).

Resultados

El principal objetivo de este estudio fue establecer los efectos de 3 activadores de PPAR (bezafibrato,



Figuras 1a-e. Efecto del tratamiento con bezafibrato (BFB), fenofibrato (FFB) y troglitazona (TRO) sobre los valores de ARNm de PPAR γ (a), PPAR α (b), ACO (c), CPT-I (d), aP2 (e), en cultivo primario de macrófagos humanos. Las células se incubaron durante 24 h con 100 μ M de bezafibrato, 100 μ M de fenofibrato o 5 μ M de troglitazona. Se analizaron 0,5 μ g de ARN total por reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-PCR). Se muestra una autorradiografía representativa y la cuantificación de los valores de ARNm normalizados respecto a la β -actina. Los valores se presentan como media \pm desviación estándar de 3 experimentos. *p < 0,05. **p < 0,01. CT: colesterol total.

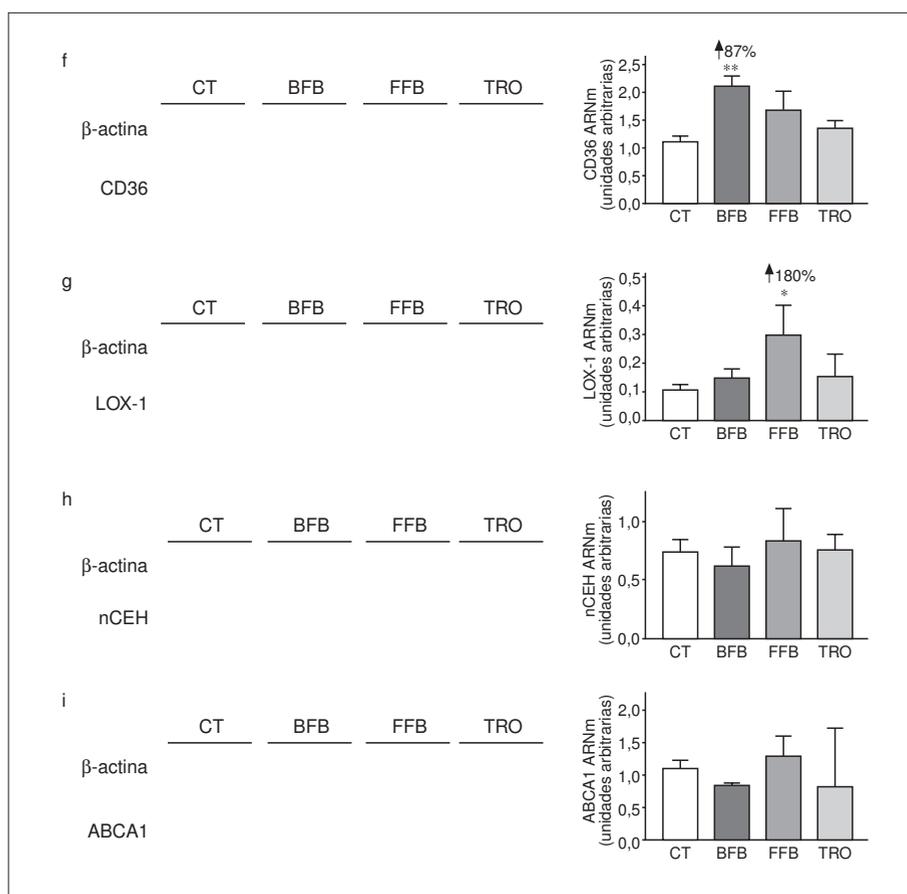
fenofibrato y troglitazona) sobre los valores de ARNm de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos y el colesterol en macrófagos y células espumosas derivadas de macrófagos. Estos fármacos activan diferentes subtipos de PPAR. Así, a las concentraciones utilizadas, el bezafibrato activa los 3 subtipos de PPAR con valores similares de EC₅₀¹⁴, mientras que el fenofibrato y la troglitazona activan de forma selectiva los PPAR α y γ , respectivamente. En la figura 1 se exponen los efectos del tratamiento con estos fármacos durante 24 h en un cul-

tivo primario de macrófagos. En primer lugar, se evaluaron los efectos de estos compuestos sobre los valores de ARNm de PPAR γ y α . No se observaron cambios tras el tratamiento, excepto en el caso del fenofibrato, que presentó un incremento significativo de las concentraciones de ARNm de PPAR γ en un 62% (p < 0,05) (fig. 1b). A continuación, se estudiaron los efectos del bezafibrato, el fenofibrato y la troglitazona sobre la expresión de varios genes diana de los PPAR implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, la ACO, la CPT-I y la proteína de unión a ácidos grasos adipocitaria (aP2)³. El tratamiento no afectó significativamente los valores de ARNm de la ACO, que cataliza la etapa limitante del proceso de β -oxidación peroxisómica de los ácidos grasos (fig. 1c). En cambio, la expresión de la CPT-I, gen que cataliza la entrada de los ácidos grasos de larga cadena en la matriz mitocondrial¹⁶ y es regulada por PPAR α y γ ³, aumentó significativamente (un 75%; p < 0,05) tras el tratamiento con troglitazona (fig. 1d). El bezafibrato aumentó un 230%

las concentraciones de ARNm de la aP2, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística (fig. 1e). Además, también se determinaron los efectos de estos fármacos sobre la expresión de 2 receptores para las LDL oxidadas, CD36 y *lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1* (LOX-1). El bezafibrato aumentó significativamente las concentraciones de CD36 (un 87%; p < 0,01), mientras que, sorprendentemente, el tratamiento con fenofibrato aumentó los valores de LOX-1 en un 180% (p < 0,05) (figs. 1f y g). Finalmente, se evaluaron los efectos de

los activadores de los PPAR sobre la expresión de 2 genes, la nCEH, implicada en la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados, y ABCA1, que participa en la secreción de colesterol. No se observaron cambios en los valores de ARNm de ninguno de estos genes tras el tratamiento con los activadores de los PPAR.

A continuación, se determinó si los ligandos de los PPAR afectaban los valores de ARNm de los genes estudiados en células espumosas. Las células espumosas se obtuvieron a partir de macrófagos incubados con 150 µg/ml de LDL acetiladas durante 48 h. Para confirmar la acumulación intracelular de lípidos en los macrófagos se realizaron tinciones con *oil red O* y la determinación de las concentración de ésteres de colesterol intracelulares (resultados no presentados). Tal como se esperaba, las células espumosas, a diferencia de los macrófagos, evidenciaron las características gotículas de lípidos en su citoplasma. Al igual que los macrófagos, estas células espumosas se trataron con los activadores de PPAR durante 24 h, lo que no modificó las concentraciones de ARNm de PPARα ni γ (figs. 2a y b). Los 3 compuestos estudiados incrementaron ligeramente los valores de ARNm de la ACO, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística (fig. 2c). Al estudiar el efecto de los fármacos sobre la CPT-I se observó que la troglitazona incrementaba significativamente su expresión en un 66% ($p < 0,01$) (fig. 2d). En estas células espumosas, el bezafibrato, el fenofibrato y la troglitazona incrementaron los valores de ARNm de la aP2 un 112% ($p < 0,01$), un 100% ($p < 0,05$) y un 130% ($p < 0,05$), respectivamente (fig. 2e). Por el contrario, no se observaron cambios en los valores de CD36 tras el tratamiento (fig. 2f),



Figuras 1f-i. Efecto del tratamiento con bezafibrato (BFB), fenofibrato (FFB) y troglitazona (TRO) sobre los valores de ARNm de CD36 (f), LOX-1 (g), nCEH (h) y ABCA1 (i) en cultivo primario de macrófagos humanos. Las células se incubaron durante 24 h con 100 µM de bezafibrato, 100 µM de fenofibrato o 5 µM de troglitazona. Se analizaron 0,5 µg de ARN total por reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-PCR). Se muestra una autorradiografía representativa y la cuantificación de los valores de ARNm normalizados respecto a la β-actina. Los valores se presentan como media ± desviación estándar de 3 experimentos. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. CT: colesterol total.

mientras que las concentraciones de ARNm de ABCA1 aumentaron un 134% ($p < 0,05$) tras el tratamiento con troglitazona (fig. 2i).

Por último, se determinó si el tratamiento con activadores de los PPAR durante 24 h afectaba la acumulación intracelular de ésteres de colesterol en las células espumosas en ausencia de un aceptor de colesterol en el medio de cultivo (fig. 3). El bezafibrato y el fenofibrato no modificaron las concentraciones de colesterol esterificado. Sin embargo, el tratamiento con troglitazona causó una reducción del 32% ($p < 0,05$) en los valores intracelulares de colesterol esterificado. Los valores de colesterol libre también disminuyeron ligeramente (un 13,5%; $p < 0,05$) tras el tratamiento con fenofibrato.

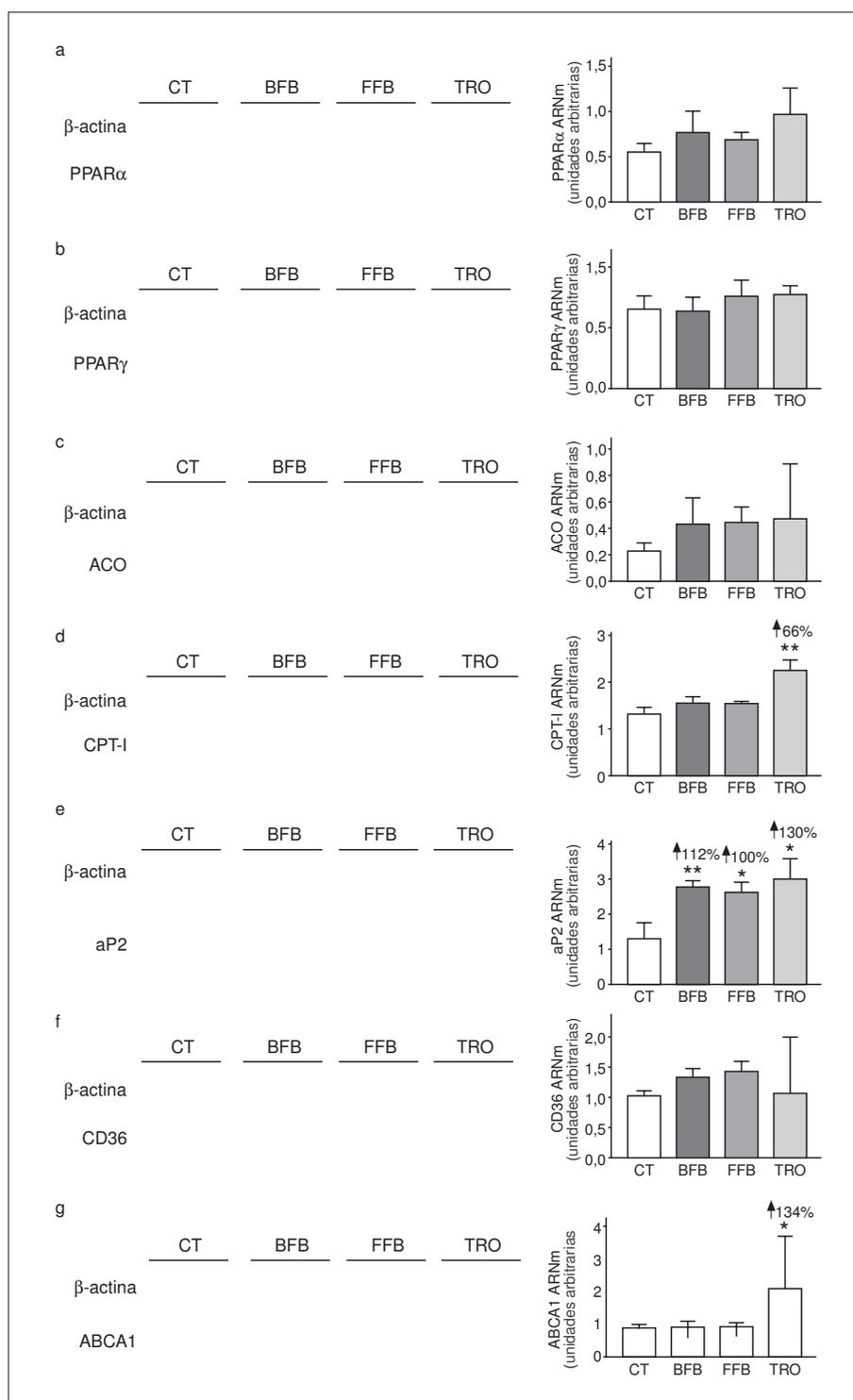


Figura 2. Efecto del tratamiento con bezafibrato (BFB), fenofibrato (FFB) y troglitazona (TRO) sobre los valores de ARNm de PPAR α (a), PPAR γ (b), ACO (c), CPT-I (d), aP2 (e), CD36 (f) y ABCA1 (g) en cultivo primario de células espumosas derivadas de macrófagos humanos. Las células fueron incubadas durante 24 h con 100 μ M de bezafibrato, 100 μ M de fenofibrato o 5 μ M de troglitazona. Se analizaron 0,5 μ g de ARN total por reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-PCR). Se muestra una autorradiografía representativa y la cuantificación de los valores de ARNm normalizados respecto a la β -actina. Los valores se presentan como media \pm desviación estándar de 3 experimentos. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. CT: colesterol total.

Discusión

Los PPAR son factores de transcripción activados por lípidos que regulan genes implicados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa, la diferenciación celular y el control de la inflamación³. La expresión de estos factores de transcripción en la pared arterial³, junto con los efectos beneficiosos de los activadores de los PPAR (fibratos y tiazolidindionas) en la aterosclerosis^{6,7}, ha llevado a los investigadores a estudiar el papel de los PPAR en esta enfermedad. Recientemente se ha publicado que tanto los activadores del PPAR α como los del PPAR γ aumentan la secreción de colesterol mediada por Apo A-I en macrófagos humanos⁵. La eliminación del colesterol de los macrófagos humanos tras el tratamiento con activadores de PPAR está mediada por la inducción de la expresión del gen que codifica para ABCA1, un transportador que controla la secreción de colesterol de los macrófagos mediada por Apo A-I. En este estudio, los macrófagos fueron tratados con activadores selectivos de PPAR α (Wy-14,463) y γ (rosiglitazona) durante 3 días. En el presente estudio los macrófagos fueron tratados durante 24 h con 3 activadores de PPAR diferentes, bezafibrato, fenofibrato y troglitazona. Al contrario que en el estudio de Chinetti et al⁵, el tratamiento de los macrófagos durante 24 h con troglitazona no modificó los valores de ARNm de

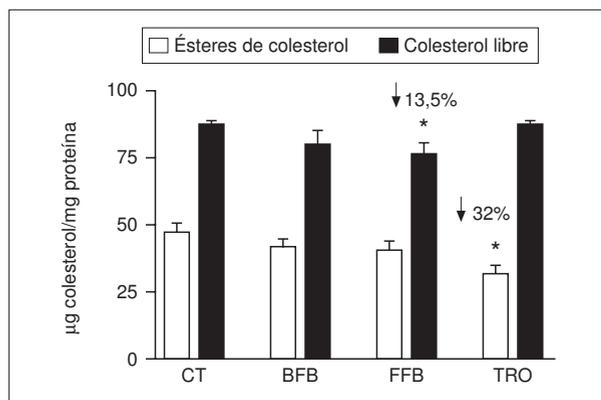


Figura 3. Efecto del tratamiento con bezafibrato (BFB), fenofibrato (FFB) y troglitazona (TRO) sobre los valores intracelulares de colesterol en cultivo primario de células espumosas derivadas de macrófagos humanos. Los macrófagos fueron convertidos en células espumosas por incubación durante 48 h con 150 µg/ml de lipoproteínas de baja densidad (LDL) acetiladas y posteriormente tratadas durante 24 h con 100 µM de bezafibrato, 100 µM de fenofibrato o 5 µM de troglitazona. Los valores se expresan como media ± desviación estándar de 3 experimentos. CT: colesterol total.

ABCA1. Esta ausencia de efecto tras 24 h de tratamiento sugiere que son necesarias exposiciones más prolongadas para observar una inducción de este gen mediada por los PPAR. La necesidad de esta mayor exposición de los macrófagos a los activadores de PPARγ para observar cambios en ABCA1 confirma que la inducción de la expresión de este gen por PPARγ está mediada indirectamente a través del receptor de los oxisteroles LXRα⁵. A diferencia de ABCA1, los valores de ARNm de CPT-I aumentaron en los macrófagos tratados con troglitazona. La CPT-I, que se encuentra localizada en la membrana mitocondrial externa, cataliza la entrada de ácidos grasos de larga cadena en la matriz mitocondrial y es uno de los principales factores que determina el flujo del proceso de β-oxidación mitocondrial¹⁶. Esta inducción de CPT-I por la troglitazona es consistente con la regulación transcripcional de este gen por PPARγ descrita por otros autores³. Además de oxidarse en la mitocondria, los derivados CoA de los ácidos grasos pueden unirse al colesterol para formar ésteres de colesterol en una reacción catalizada por la acil-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT)¹⁷. En consecuencia, es probable que un aumento en la β-oxidación mitocondrial tras el tratamiento con troglitazona, tal como sugiere la inducción de los valores de ARNm de la CPT-I, pueda reducir la disponibilidad de los ácidos grasos de cadena larga. Esta menor disponibilidad de ácidos grasos se podría traducir en una reducción de la formación de ésteres de colesterol, aumentando los

valores de colesterol libre. De hecho, en las células espumosas derivadas de macrófagos tratadas con troglitazona la inducción de los valores de ARNm de la CPT-I iba acompañada de una reducción de las concentraciones de ésteres de colesterol intracelulares, lo que sugiere que la CPT-I puede desempeñar un papel en la regulación de los valores de ésteres de colesterol en macrófagos que, además, se ha establecido previamente en un estudio en el que se demostró que la inhibición de CPT-I por el etomoxir aumentaba 3,5 veces la incorporación de colesterol marcado en los ésteres de colesterol en macrófagos¹⁸. Cabe destacar, además, que la reducción de los ésteres de colesterol intracelulares tras el tratamiento con troglitazona en células espumosas no iba acompañado de un aumento en los valores de colesterol libre, lo que indica que el tratamiento con troglitazona podría aumentar la secreción de colesterol. Esta secreción podría ser mediada por la Apo E, puesto que esta apolipoproteína puede actuar como un aceptor de colesterol libre en los macrófagos humanos¹⁹. La expresión de Apo E por los macrófagos, una apolipoproteína implicada en el transporte reverso de colesterol, previene el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en ratones, a pesar de la presencia de concentraciones plasmáticas de Apo E muy bajas^{20,21}. Además, la expresión de la Apo E en macrófagos facilita la secreción de colesterol de los macrófagos cargados de colesterol². A pesar de que en este estudio no se han determinado los valores de Apo E, su implicación en los cambios descritos en los macrófagos tratados con troglitazona concuerda con la presencia de un PPRE funcional en el promotor del gen de la Apo E, responsable de la inducción de la Apo E en macrófagos humanos tras el tratamiento con tiazolidindionas¹⁹. Por tanto, es probable que el incremento en los valores de colesterol libre provocado por la reducción en la disponibilidad de ácidos grasos se compense por un aumento en la secreción de colesterol mediada por Apo E.

La reducción de los valores intracelulares de ésteres de colesterol tras el tratamiento con troglitazona también puede deberse a cambios en la expresión de otros genes implicados en el metabolismo del colesterol, como es el caso de la nCEH. Esta enzima cataliza la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados, liberando colesterol libre que migra a la membrana plasmática y es transferido a un aceptor de colesterol, promoviendo una secreción neta del colesterol celular²². Por tanto, la nCEH puede ser un importante factor en el control de la movilización de los ésteres de colesterol de las células espumosas. Además, recientemente se ha publicado que la nCEH humana contiene un PPRE funcional²³. Sin embargo, en nuestro estudio el tratamiento con tro-

glitazona, así como con los otros activadores de PPAR utilizados, no modificó los valores de ARNm de este gen, lo que hace improbable la participación de esta enzima en los cambios observados.

El tratamiento de las células espumosas con los 3 activadores de PPAR estudiados incrementó la expresión de la aP2, lo que concuerda con la inducción de la expresión de este gen por activadores de PPAR γ ²⁴ y β ⁸ publicada por otros autores. Es necesario destacar que la aP2 es una proteína citosólica que facilita el transporte de ácidos grasos a los peroxisomas y la mitocondria. Es probable que el aumento en la expresión de la CPT-I provoque una movilización de los ácidos grasos hacia la mitocondria, que iría acompañada de un aumento de la expresión de las proteínas que le suministran estos ácidos grasos. De forma sorprendente, el fenofibrato incrementó la expresión de LOX-1, aunque son necesarios más estudios para conocer si esta proteína de membrana, que actúa como receptor de las LDL oxidadas favoreciendo su endocitosis²⁵, es regulada por los PPAR.

Mientras los efectos beneficiosos para la aterosclerosis resultantes de la activación de los PPAR α y γ en macrófagos son claros, el papel desempeñado por el PPAR β en la formación de las células espumosas es más controvertido, puesto que existen estudios que indican que los agonistas de este receptor pueden promover⁸ o reducir⁹ la acumulación de lípidos en macrófagos. En este estudio hemos utilizado bezafibrato, un fármaco que activa PPAR β , pero también PPAR α y γ . El tratamiento de los macrófagos con bezafibrato causó una inducción de la expresión de CD36, un conocido gen diana de PPAR γ ⁴. Sin embargo, el tratamiento con troglitazona no modificó la expresión de este gen, lo que sugiere que la activación de PPAR β es un estímulo más potente para este gen que la activación única de PPAR γ . Este dato corrobora los resultados de Vosper et al⁸, que mostraron que el tratamiento con un agonista selectivo PPAR β durante 48 h aumentó 6 veces los valores de ARNm de este gen, frente a las 2 veces alcanzadas con concentraciones saturantes de la rosiglitazona, una tiazolidindiona.

En resumen, este estudio muestra que el tratamiento con troglitazona induce la expresión de CPT-I, que puede reducir la disponibilidad de ácidos grasos para la esterificar el colesterol, y dar lugar a una reducción de la formación de células espumosas. Son necesarios nuevos estudios para examinar la función desempeñada por CPT-I en la acumulación intracelular de colesterol en los macrófagos, puesto que puede ser una diana potencial para reducir la formación de células espumosas.

Bibliografía

- Guyton JR. The arterial wall and the atherosclerotic lesion. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:376-81.
- Mazzone T, Reardon C. Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3. *J Lipid Res* 1994;35:1345-53.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649-88.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez J, et al. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93:241-52.
- Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, 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.
- Ericsson CG, Hamsten A, Nilsson J, et al. Angiographic assessment of effects of bezafibrate on progression of coronary artery disease in young male postinfarction patients. *Lancet* 1996;347:849-53.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands and atherosclerosis: ending the heartache. *J Clin Invest* 2000;106:629-31.
- Vosper H, Patel L, Graham TL, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem* 2001;276:44258-65.
- Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5306-11.
- Vázquez M, Zambón D, Hernández Y, 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.
- Guardiola F, Codony R, Rafecas M, et al. Selective gas chromatographic determination of cholesterol in eggs. *J Am Oil Chem Soc* 1994;71:867-71.
- Basu SK, Goldstein JL, Anderson RG, et al. 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.
- Freeman WM, Walker SJ, Kent EV. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 1999;26:112-25.
- Brown PJ, Winegar DA, Plunket KD, et al. A ureido-thioisobutyric acid (GW9578) is a subtype-selective PPAR α agonist with potent lipid-lowering activity. *J Med Chem* 1999;2:3785-8.
- Klansek JJ, Yancey P, St Clair RW, et al. Cholesterol quantitation by GLC: artifactual formation of short-chain steryl esters. *J Lipid Res* 1995;36:2261-6.
- McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyl-transferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997;244:1-14.
- Buhman KF, Accad M, Farese RV. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:142-54.
- Moinat M, Kossovsky M, Chevey JM, et al. Balance between fatty acid degradation and lipid accumulation in cultured smooth muscle cells and IC-21 macrophages exposed to oleic acid. *Comp Biochem Physiol* 1991;98:147-50.
- Galetto R, Albajar M, Polanco JJ, et al. Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region. *Biochem J* 2001;357:521-7.
- Boisvert WA, Spangenberg J, Curtiss LK. Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1995;96:1118-24.
- Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* 1995;267:1034-7.
- Ghosh S. Cholesteryl ester hydrolase in human monocyte/macrophage: cloning, sequencing, and expression of full-length cDNA. *Physiol Genomics* 2000;2:1-8.
- Ghosh S, Natarajan R. Cloning of the human cholesteryl ester hydrolase promoter: identification of functional peroxisomal proliferator-activated receptor responsive elements. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:1065-70.
- Pelton PD, Zhou L, Demarest KT, et al. 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.
- Kume N, Kita T. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:22-5.