

Efecto del tratamiento con simvastatina en la respuesta inmunitaria de los linfocitos T en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica

G. Carpeño^a, M.T. Montero^a, J. Matilla^a, J.L. Teruel^b, C. Moro^c y M.A. Lasunción^{a,d}

^aServicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

^bServicio de Nefrología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

^cUnidad de Arritmias. Servicio de Cardiología de Adultos. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

^dDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alcalá. Madrid. España.

Objetivo. Conocer el patrón de expresión de citocinas en las poblaciones de linfocitos T en sangre de enfermos con hipercolesterolemia familiar homocigótica (HFH) sometidos periódicamente a aféresis de LDL y determinar el efecto del tratamiento combinado con simvastatina.

Pacientes y métodos. Antes de cada sesión de aféresis quincenal, en el período basal y durante el tratamiento con simvastatina (40 mg/día), se extrajeron muestras de sangre que se destinaron a la determinación de lípidos y apolipoproteínas en plasma, así como al análisis mediante citometría de flujo de la síntesis de IFN- γ , IL-4 e IL-2, en los linfocitos T CD8⁻ (colaboradores) y CD8⁺ (citolíticos) tras la estimulación con PMA más ionomicina o LPS.

Resultados. El tratamiento con simvastatina produjo un descenso significativo en la concentración plasmática de cLDL (más de 80 mg/dl en promedio) y también de apo B, sin afectar al cHDL ni a la apo A-I. Las poblaciones linfocitarias eran similares en pacientes y en controles, y el tratamiento con simvastatina no alteró las proporciones de linfocitos colaboradores

(Th) con respecto a la de citolíticos (Tc). En todos los casos, la activación con ionomicina y PMA indujo preferentemente la síntesis de IFN- γ , indicando la expresión de una respuesta típicamente Th1/Tc1. Esta respuesta fue variable en pacientes y controles, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La estimulación de la sangre con LPS también indujo la producción de IFN- γ en los linfocitos T, tanto CD8⁻ como CD8⁺, aunque el número de células respondedoras era porcentualmente menor que con ionomicina y PMA. En el caso HFH-2, la respuesta al LPS en todas las ocasiones examinadas fue superior que en HFH-1 y que en controles, lo que muestra la mayor sensibilización de las células de este paciente. El tratamiento con simvastatina durante 18 semanas no produjo cambios significativos en el nivel de activación, determinado como expresión de CD69, ni en la síntesis de IFN- γ en ninguno de los tipos de linfocitos T y modelos utilizados.

Conclusiones. En estos pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica, con demostrada deficiencia de receptor LDL, el tratamiento con simvastatina a dosis de 40 mg/dl produce un importante descenso adicional de la colesterolemia con respecto a la aféresis de LDL, mientras que no perturba la respuesta inmunitaria, por lo que esta pauta terapéutica parece aconsejable para reducir el elevado riesgo aterogénico de estos pacientes.

Este trabajo se ha realizado gracias a una Beca de Investigación Merck Sharp & Dohme 1999, concedida por la Sociedad Española de Arteriosclerosis, y una Ayuda del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 99/0286).

Correspondencia: Dr. Miguel A. Lasunción.
Servicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal.
Ctra. de Colmenar, km 9,100. 28034 Madrid. España.
Correo electrónico: bioquimica_inv@hrc.es

Palabras clave:

Linfocitos T, Th1, Tc1. Citocinas. Estatinas. LPS. Citometría de flujo. Hipercolesterolemia familiar.

EFFECTS OF SIMVASTATIN TREATMENT ON IMMUNE RESPONSE IN HOMOZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIC PATIENTS

Objective. To study cytokine expression profile of blood T lymphocytes from homozygous familial hypercholesterolemic (HFH) patients treated periodically with LDL apheresis and to determine the effects of simvastatin on this profile.

Method. Blood samples were drawn immediately before the bi-weekly apheresis sessions in two HFH patients, both in the basal period and during simvastatin treatment (40 mg/day), and used for quantification of lipids and apolipoproteins in plasma and analysis of intracellular cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-2) in T-helper (CD3+CD8-) and T-cytolytic (CD3+CD8+) cells after stimulation with ionomycin plus PMA or LPS alone. Analysis was performed by multiparameter flow cytometry.

Results. Treatment with simvastatin for 18 weeks significantly reduced LDL-cholesterol levels (more than 80 mg/dl on average) in these patients. A parallel reduction was also observed for apo B, with no changes in HDL cholesterol or apo A-I. T lymphocyte populations were similarly distributed in patients and controls, and simvastatin therapy did not alter this distribution. In all cases, activation with ionomycin plus PMA resulted in the preferential induction of IFN- γ , thereby indicating a Th1/Tc1 response. This response was variable in hypercholesterolemic patients and in controls; however, the differences were not statistically significant. LPS stimulation also induced IFN- γ production, both in CD8- and CD8+ T lymphocytes; however, the responding cells were notably fewer than when ionomycin and PMA were used as stimuli. In all studied samples, cells from patient HFH-2 responded to LPS more intensely than those from HFH-1 or controls, which indicate a greater sensitivity to this immune stimulus. Simvastatin therapy did not change this parameter significantly, as determined by CD69 expression and IFN- γ synthesis in any of the T-lymphocyte populations and models used.

Conclusions. In these HFH patients, with absolute LDL receptor deficiency, treatment with 40 mg/day simvastatin did not modify the immune response but produced an additional reduction in LDL-cholesterol levels, which may be beneficial for the management of these high-risk patients.

Key words:

T, Th1 and Tc1 lymphocytes. Cytokines. Statins. LPS. Flow cytometry. Familial hypercholesterolemia.

Introducción

La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad hereditaria del metabolismo de las lipoproteínas causada por alteraciones del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El estado homocigoto es raro, aparece en 1 de cada millón de personas aproximadamente y se caracteriza por concentraciones de colesterol en suero de 600-1.000 mg/dl, además de la aparición en edades tempranas de xantomas tendinosos y cutáneos, arco corneal, así como enfermedad arterial coronaria en la infancia. Son pacientes altamente resistentes al tratamiento con fármacos y dietas, dada la no funcionalidad del receptor LDL. La eliminación extracorpórea del colesterol, principalmente mediante la aféresis selectiva de LDL, es el tratamiento que mayores beneficios produce^{1,2}. Últimamente también se considera el tratamiento combinado con estatinas³. Efectivamente, en ratones deficientes de receptor LDL se ha demostrado que la administración de atorvastatina reduce la secreción hepática de colesterol y de apolipoproteína (apo) B al plasma, disminuyendo la concentración circulante de colesterol⁴. En pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica (HFHo), el tratamiento con dosis de 40 mg/día o superiores de simvastatina o de atorvastatina también produce una reducción significativa de la concentración plasmática de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL)^{5,6}, lo que se interpreta como resultado de la inhibición de la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)/LDL. Este efecto seguramente se debe a la fuerte inhibición de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que reduciría la disponibilidad de colesterol para la formación de las lipoproteínas. Por lo tanto, aparte de su conocido efecto estimulando la expresión del receptor LDL, en los pacientes con receptor no funcional las estatinas logran disminuir la hipercolesterolemia a través de la inhibición de la producción de lipoproteínas, por lo que también en estos casos tienen utilidad terapéutica.

El rápido descenso de los episodios cardiovasculares que se consigue tras la instauración del tratamiento con estatinas, superior al esperado por la reducción de la colesterolemia, ha llevado a sugerir que su beneficio clínico podría deberse, al menos en parte, a efectos pleiotrópicos independientes del colesterol⁷. A este respecto, son numerosos y de diversa naturaleza los efectos que producen las estatinas y que tienen relación con la enfermedad cardiovascular de origen aterosclerótico⁸⁻¹².

En cultivos de células mononucleadas de sangre periférica humana, en nuestro laboratorio demos-

tramos por primera vez que las estatinas estimulaban la enzima caspasa 1 y, consecuentemente, el procesamiento y secreción de las interleucinas (IL) 1 β e IL-18 por los monocitos¹³. Esta acción determinaba que la secreción de interferón (IFN) γ en respuesta a *Mycobacterium tuberculosis*, como estímulo inmunitario, se multiplicara cuando las células se incubaban simultáneamente con fluvastatina¹³. Estos resultados permitían sugerir que, en determinadas enfermedades infecciosas, el tratamiento con estatinas podría estimular una respuesta inflamatoria de tipo local, con efectos favorables desde el punto de vista del control de la infección.

En la placa de ateroma se produce una respuesta inmunitaria desencadenada por la acumulación de LDL modificadas en la íntima arterial. El análisis de los tipos celulares presentes y la expresión de citocinas ha permitido establecer que durante las primeras etapas de estría grasa se da una respuesta inflamatoria de tipo Th1, con expresión de IFN- γ e IL-12; cuando avanza la lesión, a este fenotipo se le suma uno de tipo Th2, con expresión de IL-4 e IL-10^{14,15}. Por su parte, la propia hipercolesterolemia parece contribuir al equilibrio Th1/Th2 en el organismo, y se ha comprobado que la alimentación con una dieta aterogénica en ratones deficientes de apo E favorece una respuesta de tipo Th2¹⁶.

Con estos antecedentes, en el presente trabajo nos planteamos, en primer lugar, conocer el patrón de expresión de citocinas de los linfocitos T CD3+CD8- y CD3+CD8+ en los enfermos con HFHo que regularmente se tratan con aféresis de LDL en nuestro hospital y, en segundo lugar, determinar el efecto del tratamiento combinado con simvastatina sobre dicho patrón.

Pacientes y métodos

Pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica y controles

El grupo control está constituido por 9 voluntarios sanos normocolesterolémicos, con una media de edad de 55 años. Se estudió a 2 pacientes con HFHo tratados desde hace más de 10 años con aféresis de LDL (Liposorber LA-15, Kaneka), con una sesión cada 15 días. El primero de ellos es un varón de 19 años (HFHo-1) que es portador en homocigosis de la mutación en el receptor LDL FH_{Colmenar} (N804K)¹⁷; hasta la fecha no presenta signos de enfermedad cardiovascular. El segundo caso (HFHo-2) es una mujer de 37 años, heterocigota compuesta, que presenta las mutaciones D280G (exón 6) y G528V (exón 11) en dicho receptor¹⁸. Esta paciente presenta una insuficiencia valvular aórtica, pero en el momento del presente estudio su situación era estable. Antes de cada sesión se les extrajo una muestra de sangre para los análisis programados. Durante el período basal se tomaron 9 muestras en otras tantas sesiones de aféresis consecutivas. En todas ellas se realizaron las determinaciones de los parámetros lipídicos; en 3 de esas ocasiones

se analizó el perfil de secreción de citocinas. Sin alterar la pauta de la aféresis de LDL, ambos pacientes se sometieron también a tratamiento con simvastatina (40 mg/día), y se tomaron muestras de sangre en las 9 sesiones posteriores; en todas ellas se determinaron los lípidos, mientras que la respuesta inmunitaria sólo se analizó en las semanas 6, 12 y 18 de tratamiento con la estatina. Todos dieron su consentimiento para someterse a este estudio, que estaba aprobado por el Comité Ético de Ensayos Clínicos del Hospital Ramón y Cajal.

Extracción de sangre y determinaciones bioquímicas y hematológicas

En el momento de la extracción, ninguno de los individuos del estudio manifestaba signos de presentar enfermedad infecciosa ni episodio alérgico agudo. La sangre se extrajo por la mañana en ayunas, salvo en los pacientes HFHo, que se les extrajo momentos antes de iniciarse la sesión de aféresis. Un tubo seco se destinó para la analítica general en suero, que se realizó con un autoanalizador Hitachi modelo 737. Un segundo tubo de sangre se destinó para el recuento de células sanguíneas, que se realizó con un equipo Coulter modelo H-6000. Otra alícuota se recogió sobre ácido etilendiaminetetraacético (EDTA)-Na, para la separación del plasma y valoración de los parámetros lipídicos, a saber, colesterol total y triglicéridos totales mediante métodos enzimáticos colorimétricos (Menarini) en un autoanalizador RA-1000 (Menarini Diagnósticos) y apo A-I, apo B-100 y lipoproteína(a) mediante nefelometría Behring Nephelometer Analyzer BNA-150 (Dade Behring). Para la determinación de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL), el plasma se precipitó con ácido fosfotungstomálico-Mg (Roche). La concentración de colesterol en LDL (cLDL) se calculó con la fórmula de Friedewald. Finalmente, se recogió un tubo de sangre de 10 ml con heparina de sodio como anticoagulante, que se destinó al estudio de la respuesta inmunitaria linfocitaria.

Estudio del perfil Th1-Th2 y Tc1-Tc2

La sangre recogida sobre heparina se diluyó 1:1 con RPMI 1640 (Gibco) en tubos estériles, a uno de los cuales se adicionó 1 μ g/ml de ionomicina (Sigma) para producir la apertura de los canales de calcio, 25 ng/ml de PMA (Sigma) para activar la proteína C cinasa, y 10 μ g/ml de brefeldina A (Sigma). La brefeldina A es un metabolito de origen fúngico que impide el transporte anterógrado desde el retículo endoplásmico al Golgi, impidiendo de esta forma la salida de la célula de las proteínas que se sintetizan. Con todo ello se consigue la activación máxima de los linfocitos T y se posibilita el estudio de las proteínas sintetizadas mediante citometría de flujo. Como control se destina otro tubo en las mismas condiciones pero que no contiene ionomicina ni PMA. Ambos son incubados durante 4 h a 37 °C en un incubador con CO₂ al 5%.

Activación con lipopolisacárido (LPS)

Inmediatamente después de la extracción, la sangre se distribuyó en placas multipocillo y se mezcló 1:1 con medio RPMI 1640 (Gibco) que contenía suero bovino fetal al 10% (Myclone), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycin y 100 μ g/ml de gentamicina (Gibco). Para activar las células, a uno de los pocillos se añadió LPS (500 μ g/ml) (Difco Laboratories), mientras que otro se dejó intacto y servía como control de las células en reposo. Las placas se mantuvieron durante 8 h a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5%. Justo 4 h antes de finalizar el tiempo de incubación previsto, se añadieron 10 μ g/ml de brefeldina A (Sigma). La acumulación intracelular de citocinas se analizó mediante citometría de flujo.

Marcación en superficie de linfocitos y determinación de citocinas intracelulares para su estudio por citometría de flujo

Tanto la sangre empleada para el estudio del perfil Th1/Th2 y Tc1/Tc2 como la incubada con LPS se procesaron de la misma forma. Se tomaron 100 µl de la muestra y se incubaron con los anticuerpos frente a antígenos de superficie anti-CD3 marcado con APC y anti-CD8 marcado con Per-CP (Becton Dickinson); tras fijar, lavar y permeabilizar (Intrastain, Dako), se incubaron con anticuerpos frente a antígenos intracelulares anti-IFN-γ marcado con FITC y anti-CD69 marcado con PE (Becton Dickinson) en el caso de la sangre activada con LPS. Para el estudio del perfil Th/Tc, un tubo se incubó con los anticuerpos anti-IL-2 marcado con FITC y anti-CD69 marcado con PE (Becton Dickinson) y otro con los anticuerpos anti-IFN-γ marcado con FITC y anti-IL-4 marcado con PE (Becton Dickinson). Se volvió a lavar y finalmente se resuspendieron las células en paraformaldehído para dejarlas fijadas. Se mantuvieron en la cámara fría a 4 °C hasta pasarlas por el citómetro, lo cual siempre era antes de que transcurrieran 24 h desde la marcación.

Adquisición y análisis por citometría de flujo

Se utilizó un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson) provisto de 2 láseres, que permite detectar 4 fluoróforos simultáneamente. Se adquirieron 10.000 linfocitos T, seleccionados por ser CD3+. A partir de ahí se seleccionaron las células CD8- (que corresponden mayoritariamente a las CD4+, es decir, linfocitos T colaboradores o Th) y las células CD8+ (que corresponden a los linfocitos T citolíticos o Tc) y se analizó en ellas la expresión de los pares de antígenos IFN-γ/CD69, IL-2/CD69 e IFN-γ/IL-4, según el caso. En todos los casos se determinó el número de células que expresaba cada uno de esos antígenos en respuesta a la activación (LPS o ionomicina-PMA), tras haber fijado el dintel en la primera década de fluorescencia con ayuda de los correspondientes isotópicos. En las muestras de sangre no sometidas a la activación, el porcentaje de células que superaba dicho umbral era insignificante. La adquisición y el análisis se realizó con el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA (ANALYSIS OF VARIANCE between groups) seguido del test de Student-Neuman-Keuls. El efecto del tratamiento con simvastatina se analizó mediante la t de Student. Todos los cálculos se efectuaron con el programa Statgraphics plus (Statistical Graphics Corporation).

Resultados

Concentraciones plasmáticas de lípidos y apolipoproteínas

Como se observa en la tabla 1, los 2 enfermos con hipercolesterolemia familiar homocigótica (HFHo-1 y HFHo-2) presentaron, en el conjunto de las 9 ocasiones analizadas en el período basal, concentraciones de colesterol total, cLDL y apo B-100 muy elevadas con respecto al grupo control. Hay que tener en cuenta que las muestras corresponden

Tabla 1. Concentraciones de lípidos y apolipoproteínas en plasma (mg/dl)

	HFHo-1 (n = 9)	HFHo-2 (n = 9)	C (n = 9)
Colesterol	421,6 ± 35,7 ^a	487,6 ± 21,2 ^a	194,1 ± 20,9 ^a
Triglicéridos	72,6 ± 54,4	86,0 ± 29,4	116,0 ± 68,7
cHDL	53,1 ± 4,3 ^a	45,3 ± 3,7 ^a	43,4 ± 11,03 ^a
cLDL	355,9 ± 28,7 ^a	432,2 ± 26,7 ^a	127,6 ± 18,4 ^a
Apo A-I	120,5 ± 8,2	116,4 ± 8,3	125,4 ± 18,5
Apo B-100	193,5 ± 15,08 ^a	237,4 ± 22,1 ^a	95,8 ± 11,9 ^a

Medias ± desviación estándar. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y test de Student-Neuman-Keuls. HFHo: hipercolesterolemia familiar homocigótica, casos 1 y 2; C: controles.

^aDiferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

al momento justo antes de la aféresis de LDL; por lo tanto, se puede considerar que esas son las concentraciones máximas que alcanzaban con esta pauta de tratamiento bisemanal con aféresis. En cuanto a las concentraciones de cHDL y apo A-1, las diferencias son poco destacables (tabla 1).

Perfiles Th1/Th2 y Tc1/Tc2 en los grupos estudiados

Las proporciones de las distintas poblaciones de linfocitos T en sangre se muestran en la tabla 2. Se puede observar que en todos los casos la población de linfocitos T colaboradores (Th) (CD3+CD8-) fue mayoritaria con respecto a la de citolíticos (Tc) (CD3+CD8+). En el paciente HFHo-1 estas proporciones fueron muy similares a las observadas en los controles, mientras que la paciente HFHo-2 presentaba una proporción de linfocitos CD8+ aumentada, en detrimento de los CD8-.

Para analizar el tipo de respuesta, la sangre se activó máximamente con ionomicina y PMA. Se determinó la expresión de CD69 como marcador de activación de los linfocitos. Como se muestra en la tabla 3, en los pacientes con HFHo y en los con-

Tabla 2. Porcentaje de células CD8- y células CD8+ con respecto al total de linfocitos T (CD3+) en individuos controles, así como en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica (HFHo) antes (basal) y durante el tratamiento con simvastatina

	HFHo-1 (n = 3)	HFHo-2 (n = 3)	C (n = 9)
<i>Basal</i>			
CD8-/CD3+	69,12 ± 0,35	54,68 ± 0,83	63,93 ± 9,54
CD8+/CD3+	30,44 ± 0,35	44,63 ± 1,02	35,25 ± 9,41
<i>Simvastatina</i>			
CD8-/CD3+	68,72 ± 0,81	50,72 ± 1,07	
CD8+/CD3+	30,33 ± 0,33	48,28 ± 0,77	

Medias ± desviación estándar.

troles, la suma de las células CD8⁻ y CD8⁺ que expresaban el marcador CD69 alcanzaba prácticamente el 100% de las células CD3⁺, lo que muestra que todos los linfocitos T (CD3⁺) se activaron por acción de aquellos agentes. En todos los casos, el número de linfocitos T CD8⁻ activados fue superior, prácticamente el doble, que el de CD8⁺, lo que se corresponde con las proporciones de estas células que se detectan en sangre.

La IL-2 se estudió por su interés como factor necesario para la proliferación de los linfocitos T. En el grupo control, los linfocitos colaboradores (CD8⁻) que sintetizaban IL-2 en respuesta a ionomicina y PMA representaban el 15% de los linfocitos T (CD3⁺), mientras que los linfocitos T citolíticos (CD8⁺) contribuían en menos del 4% (tabla 3). En los pacientes con HFHo, especialmente en el caso 1, la proporción de linfocitos T sintetizadores de IL-2 fue muy baja (en total, 3 y 12,4%, respectivamente), lo que podría indicar una capacidad de respuesta inmunitaria disminuida en estos individuos con respecto a los controles (18,7%) (tabla 3).

La síntesis de IFN- γ se estudió por ser marcador de la respuesta inflamatoria, Th1 o Tc1, mientras que la IL-4 se considera un marcador de la respuesta inmune humoral, Th2 o Tc2. En los controles, los linfocitos T que sintetizaron IFN- γ en respuesta a PMA más ionomicina fue de un 14% aproximadamente con respecto al total, de los cuales el 6% correspondía a los colaboradores (CD8⁻) y el 8%, a los citolíticos (CD8⁺) (tabla 3). En cuanto a los pacientes, destaca que HFHo-1 presentara un porcentaje de linfocitos T sintetizadores de IFN- γ muy bajo, menos del 2% en total, mientras que en HFHo-2 los datos fueron muy similares a los hallados en los controles (tabla 3).

En cuanto a la síntesis de IL-4, los porcentajes de células positivas para dicha interleucina fueron muy bajos, sin diferencias dignas de mención entre los grupos (tabla 3). En todos los casos el porcentaje de células sintetizadoras de IL-4 fue inferior que el de IFN- γ , tanto en los linfocitos colaboradores como en los citolíticos, por lo que puede considerarse que en todos ellos la respuesta fue típicamente inflamatoria, Th1 y Tc1, con secreción de IFN- γ .

Activación de la sangre con LPS

La adición conjunta de ionomicina y PMA se emplea experimentalmente para activar máximamente los linfocitos T, pero dichos agentes no son estímulos fisiológicos. Para acercarnos a la respuesta que se podría producir ante una infección, procedimos también a incubar la sangre en presencia de LPS, antígeno de las bacterias gramnegati-

Tabla 3. Expresión de CD69 e interleucinas intracelulares en los linfocitos T de sangre en respuesta a ionomicina y PMA

	HFHo-1 (n = 3)	HFHo-2 (n = 3)	C (n = 9)
CD69, CD8 ⁻	70,6 \pm 0,85	62,3 \pm 0,84	69,2 \pm 8,60
CD69, CD8 ⁺	29,2 \pm 1,02	37,3 \pm 0,77	29,7 \pm 8,43
IL-2, CD8 ⁻	2,69 \pm 2,07	10,8 \pm 1,70	15,0 \pm 15,4
IL-2, CD8 ⁺	0,28 \pm 0,23	1,55 \pm 0,20	3,71 \pm 4,52
IFN γ , CD8 ⁻	0,88 \pm 0,84	6,33 \pm 3,49	6,08 \pm 5,62
IFN γ , CD8 ⁺	0,67 \pm 0,56	10,5 \pm 5,03	8,12 \pm 7,37
IL-4, CD8 ⁻	0,24 \pm 0,14	1,46 \pm 0,91	1,70 \pm 2,08
IL-4, CD8 ⁺	0,05 \pm 0,03	0,40 \pm 0,16	2,08 \pm 3,20

Medias \pm desviación estándar. HFHo: hipercolesterolemia familiar homocigótica, casos 1 y 2; C: controles.

Los datos corresponden al porcentaje de células positivas para cada marcador medido en linfocitos T CD8⁻ (colaboradores) y en CD8⁺ (citotíticos), con respecto al total de células CD3⁺ (linfocitos T).

vas, y se estudió la expresión de CD69 e IFN- γ . Como muestra la tabla 4, la activación de los linfocitos que se consiguió con este estímulo fue marcadamente inferior que con ionomicina y PMA. Con LPS, el número de células CD3⁺ que expresaban CD69 en ningún caso superaban el 50% del total, que es menos de la mitad que con ionomicina y PMA (tabla 3). Independientemente de ello, la estimulación de los linfocitos T colaboradores y de los citolíticos era equivalente, pues los porcentajes de los que expresaban CD69 estaban en proporción con su abundancia relativa en sangre.

La expresión de IFN- γ también fue inferior con LPS que con ionomicina y PMA, y en ningún caso se superó el 2% del total de linfocitos T (tabla 4). Hay que señalar que, al igual que ocurría con ionomicina y PMA, en el caso de la paciente HFHo-2 el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ sintetizadores de IFN- γ era superior que el de CD8⁻, lo que puede in-

Tabla 4. Expresión de CD69 e IFN- γ en los linfocitos T de sangre incubada en presencia de LPS durante 8 h

	HFHo-1 (n = 3)	HFHo-2 (n = 3)	C (n = 9)
CD69, CD8 ⁻	32,9 \pm 2,86	22,4 \pm 6,78	17,9 \pm 14,2
CD69, CD8 ⁺	16,0 \pm 3,05	22,6 \pm 7,24	13,0 \pm 10,1
IFN γ , CD8 ⁻	0,10 \pm 0,03 ^a	0,48 \pm 0,21 ^a	0,17 \pm 0,12 ^a
IFN γ , CD8 ⁺	0,08 \pm 0,03 ^a	1,12 \pm 0,01 ^a	0,16 \pm 0,17 ^a

Los datos corresponden al número de células positivas para cada marcador medido en linfocitos T CD8⁻ (colaboradores) y en CD8⁺ (citotíticos), expresado en porcentaje con respecto al total de células CD3⁺ (linfocitos T; medias \pm desviación estándar). Los resultados se analizaron mediante ANOVA y test de Student-Neuman-Keuls. HFHo: hipercolesterolemia familiar homocigótica, casos 1 y 2; C: controles.

^aDiferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

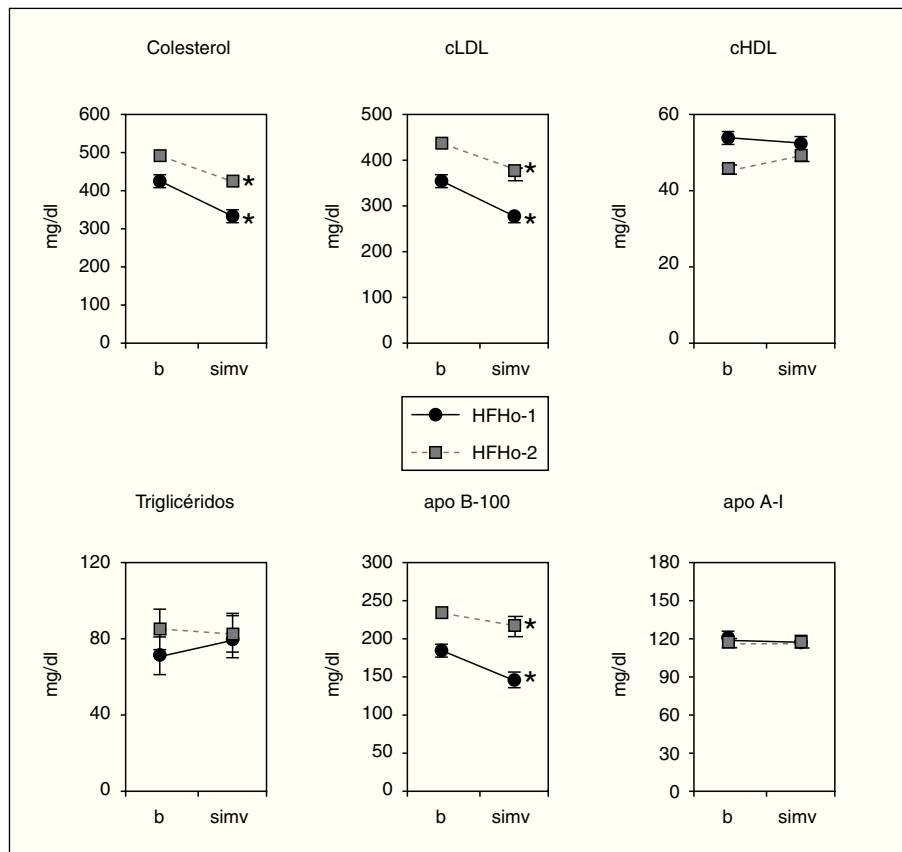


Figura 1. Efecto del tratamiento con simvastatina en el perfil de lípidos y apolipoproteínas en plasma, en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica sometidos a aféresis de LDL. El tratamiento con simvastatina (40 mg/día) se prolongó durante 18 semanas. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar de 9 muestras consecutivas obtenidas en cada período de estudio: basal (b) y simvastatina (simv). La comparación estadística frente al basal se realizó mediante la prueba de la t de Student; *p < 0,05. HFHo-1: caso 1 (línea continua); HFHo-2: caso 2 (línea punteada).

dicar una mayor sensibilización al LPS en este caso.

Efecto del tratamiento con simvastatina en los pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica sobre los parámetros lipídicos en plasma y el perfil de respuesta inmunitaria

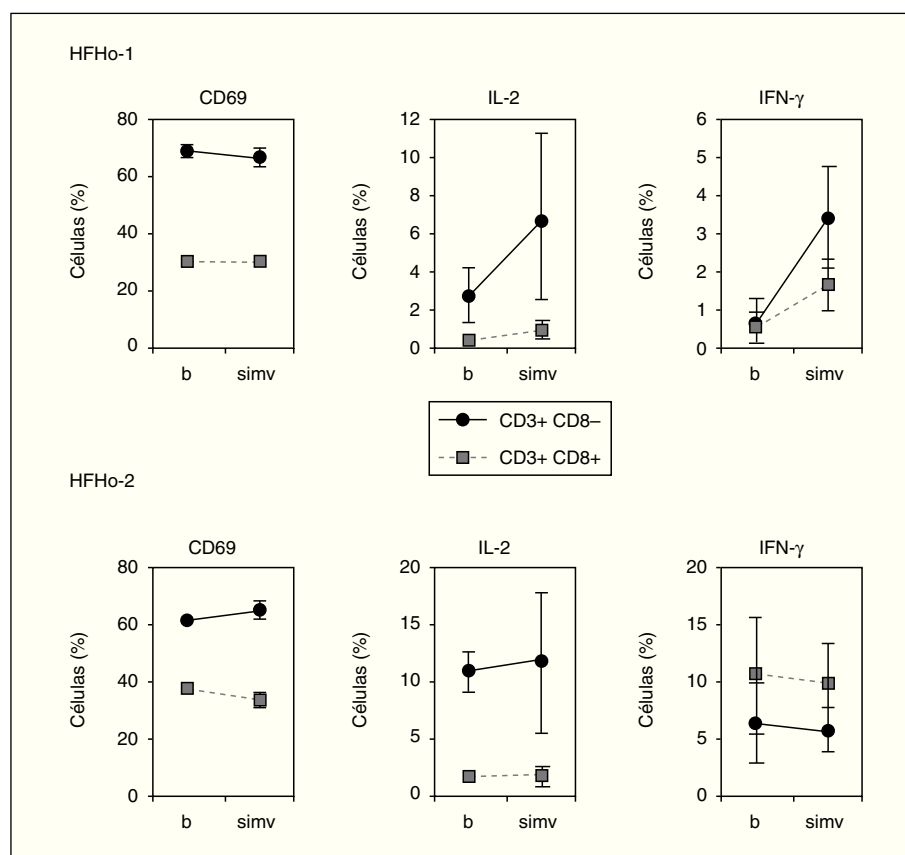
El tratamiento con 40 mg/día de simvastatina produjo un descenso significativo en las concentraciones de colesterol total, cLDL y apo B-100 en ambos pacientes (fig. 1). En cLDL concretamente, este descenso fue de unos 80 mg/dl en promedio, lo que demuestra la efectividad del tratamiento combinado de la aféresis de LDL y simvastatina para el control de la colesterolemia en estos pacientes con HFHo. Por su parte, las concentraciones de cHDL y de apo A-I no se modificaron apreciablemente por el tratamiento con la estatina (fig. 1).

El tratamiento con simvastatina no modificó las proporciones de linfocitos T colaboradores y citolíticos con respecto a la situación basal. Durante el tratamiento estos porcentajes fueron en HFHo-1: CD8⁻, $68,7 \pm 0,5\%$ y CD8⁺, $30,3 \pm 0,2\%$; y en HFHo-2: CD8⁻, $50,7 \pm 0,8\%$ y CD8⁺, $48,3 \pm 0,5\%$.

Los resultados del estudio de los perfiles Th1/Tc1 y Th2/Tc2 se muestran en la figura 2. Los datos del período basal en esta figura corresponden a los ya comentados en los apartados anteriores, cuando se comparaban con el grupo control. Como puede observarse, en función de los resultados de expresión de CD69, el tratamiento con simvastatina no modificó la activación máxima inducida por ionomicina y PMA, tanto en linfocitos T CD8⁻ como CD8⁺, en ninguno de estos 2 pacientes con HFHo (fig. 2).

En cuanto a la síntesis de citocinas, en el paciente HFHo-2 el tratamiento con simvastatina no alteró la capacidad de síntesis de IL-2 e IFN- γ en ningún tipo de linfocitos T (fig. 2). En el paciente HFHo-1, que partía de unos valores basales realmente bajos, el tratamiento incrementó el número de linfocitos sintetizadores de estas citocinas, especialmente IFN- γ , aunque la alta variabilidad y el pequeño número de muestras tomadas en cada período impide apreciar diferencias estadísticamente significativas (fig. 2). De todos modos, puede decirse que, en este paciente, durante el período de tratamiento con simvastatina se restableció la capacidad de respuesta inmuni-

Figura 2. Efecto del tratamiento con simvastatina en el perfil Th1/Tc1 en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica sometidos a aféresis de LDL. HFHo-1: caso 1; HFHo-2: caso 2. Los datos corresponden al número de células positivas para cada marcador medido en linfocitos T CD8⁻ (colaboradores) (línea continua) y en CD8⁺ (citolíticos) (línea punteada), expresado en porcentaje con respecto al total de linfocitos T, observados en sangre incubada en presencia de ionomicina y PMA. El tratamiento con simvastatina (40 mg/día) se prolongó durante 18 semanas. Medias \pm desviación estándar de 3 muestras obtenidas en cada período de estudio: basal (b) y simvastatina (simv).



taria a niveles comparables a los de los controles.

Por último, se analizó la respuesta de la sangre al LPS, cuyos resultados se muestran en la figura 3. El tratamiento con simvastatina durante 18 semanas no produjo cambios en el nivel de activación, determinado como expresión de CD69, ni en la síntesis de IFN- γ en ninguno de los tipos de linfocitos T (fig. 3), por lo que puede concluirse que en estos 2 pacientes con deficiencia de receptor LDL en condición homocigótica, el tratamiento con simvastatina a dosis de 40 mg/día no perturba la respuesta inmunitaria.

Discusión

Está plenamente aceptado que la arteriosclerosis es una enfermedad de carácter inflamatorio, y que las células de la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, y los mediadores que segregan participan en la iniciación, el crecimiento y la rotura de las placas ateromatosas. La hipercolesterolemia es un factor de riesgo causal de la aterosclerosis, y su control reporta claramente beneficios en cuanto a la aparición de episodios clínicos de ori-

gen isquémico. En este contexto, en el presente trabajo nos planteamos, en primer lugar, analizar el perfil de síntesis de citocinas en los linfocitos T sanguíneos en 2 pacientes con HFHo, con defecto en el receptor LDL, que están siendo tratados con aféresis de LDL. Mediante estimulación con ionomicina y PMA, se analizó la expresión máxima de diversas citocinas. En ningún caso se observó una síntesis de IL-4 digna de mención, pero sí de IFN- γ , por lo que en todos ellos los linfocitos T estaban programados para una respuesta de tipo Th1-Tc1.

Los pacientes con HFHo aquí estudiados estaban siendo tratados periódicamente con aféresis de LDL, y aun así presentaban picos de hipercolesterolemia. En estas condiciones basales, uno de ellos presentaba un patrón de secreción de citocinas totalmente equiparable a la de los controles, mientras que el otro lo tenía francamente disminuido, tanto cuando se analizó en respuesta a ionomicina y PMA como a LPS. Dicho paciente no mostraba signos clínicos de inmunodepresión, es el más joven de los 2 y tampoco presenta signos de aterosclerosis, por lo tanto desconocemos la causa de dicho perfil. Rovers et al¹⁹ determinaron

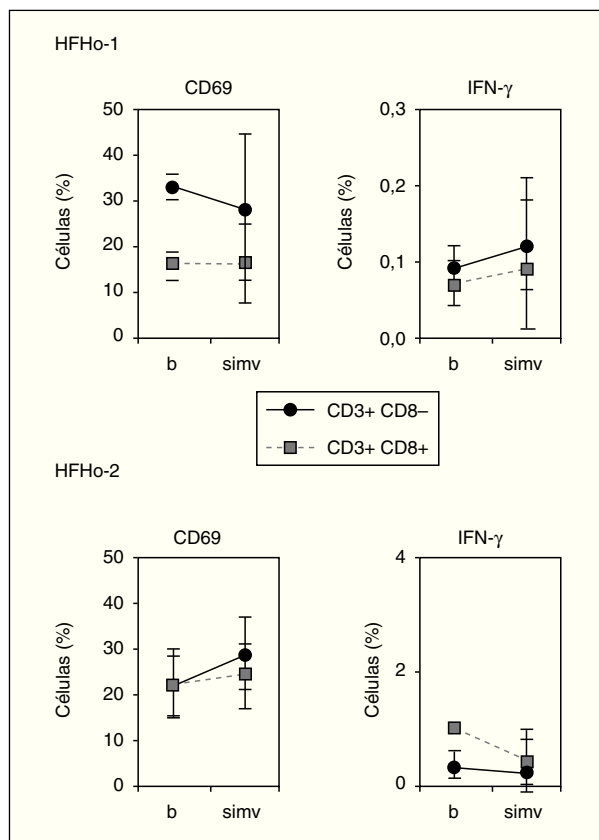


Figura 3. Efecto del tratamiento con simvastatina en la respuesta al LPS en sangre de pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica sometidos a aféresis de LDL. HFHo-1: caso 1; HFHo-2: caso 2. Los datos (medias \pm desviación estándar) corresponden al número de células positivas para cada marcador medido en linfocitos T CD8- (colaboradores) (línea continua) y en CD8+ (citotóxicos) (línea punteada), expresado en porcentaje con respecto al total de linfocitos T, observados en sangre incubada en presencia de LPS. El tratamiento con simvastatina (40 mg/día) se prolongó durante 18 semanas. Medias \pm desviación estándar de 3 muestras obtenidas en cada período de estudio: basal (b) y simvastatina (simv).

la producción de IL-1 β y de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) procedentes de 3 pacientes con HFHo tras la estimulación con LPS y observaron que, con respecto a sus familiares heterocigotos, no había diferencias significativas en dicha respuesta, y tampoco las había en cuanto a las concentraciones plasmáticas de dichas citocinas. Otros autores han estudiado la capacidad de producción de citocinas *in vitro* de las células sanguíneas de individuos con hipercolesterolemia (no HFHo) en respuesta al LPS, y los resultados son contradictorios²⁰⁻²². Por lo tanto, los resultados no permiten concluir que la hipercolesterolemia en

humanos comprometa la capacidad de respuesta inmunitaria.

En animales de experimentación los resultados difieren. Así, los ratones con deficiencia de receptor LDL (LDLR $^{-/-}$) o de apo E (apo E $^{-/-}$) son muy susceptibles a la infección por hongos²³ y bacterias intracelulares^{24,25}. También son más susceptibles a la infección por virus²⁶, lo que se ha atribuido a la menor capacidad de defensa a cargo de los linfocitos T CD8 $^{+}$ ²⁶. De hecho, se ha observado que la administración de una dieta hipercolesterolémica a ratones deficientes de apo E que promueve la diferenciación de tipo Th2¹⁴, lo que reduciría la respuesta de los linfocitos T citotóxicos ante la infección.

Las estatinas ejercen acciones inmunomoduladoras. En nuestro laboratorio se describió por primera vez que las estatinas *in vitro* activan la caspasa 1 en PBMC de humanos y, como consecuencia, estimulan la secreción de IL-1 β y de IL-18 y, secundariamente, también la de IFN- γ ¹³. Posteriormente, Kiener et al²⁷ han corroborado estos resultados en lo que respecta a la secreción de IL-1 β , y Neuhaus et al¹² en cuanto al aumento de la producción de IFN- γ por efecto de la simvastatina. Además de estos efectos que pueden considerarse proinflamatorios, las estatinas ejercen *in vitro* también efectos de tipo antiinflamatorio, como la disminución de la producción de TNF- α ^{12,28} y la inhibición de la expresión del complejo MHC-II inducido por IFN- γ ⁹. Por lo tanto, el efecto neto de las estatinas en el equilibrio Th1/Th2 es difícil de predecir.

En animales de experimentación, los efectos de las estatinas parecen más homogéneos. En modelos de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), una enfermedad del sistema nervioso central de tipo inflamatorio mediada por los linfocitos T CD4 $^{+}$, se ha observado que la administración de atorvastatina o de lovastatina reduce la expresión de MHC-II y la secreción de citocinas Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ y TNF- α), mientras que incrementa la de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10)^{29,30}. En humanos, los datos de que se dispone acerca de los efectos inmunomoduladores de las estatinas son más limitados. Por un lado, el tratamiento con simvastatina reduce las concentraciones plasmáticas de PCR y TNF- α ³¹, así como los de IL-8 y proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1)³², mientras que existe polémica sobre los de IL-6³¹⁻³³. En lo que respecta a la producción *in vitro* de citocinas por las PBMC estimuladas con LPS, de nuevo hay resultados contradictorios, pues Rosenson et al³⁴ comunicaron que el tratamiento *in vivo* con pravastatina reduce la producción de TNF- α y de IL-6, mientras que de Bont et al²¹ no observan cambios

en la producción de TNF- α , IL-6 ni IL-1 β , y Morschladt et al²², tampoco en la secreción de TNF- α e IL-10.

Nosotros quisimos contribuir a este estudio analizando los efectos del tratamiento con simvastatina en los pacientes con HFHo sometidos regularmente a aféresis de LDL. A pesar de que el tratamiento combinado fue muy eficaz en lo que respecta a la reducción de la hipercolesterolemia, en el perfil de producción de citocinas no observamos efectos consistentes en los 2 pacientes. De hecho, en el paciente HFHo-2, que en la situación basal mostraba un perfil muy similar al de controles (tablas 3 y 4), el tratamiento con simvastatina durante 4,5 meses no lo modificó (figs. 2 y 3). El paciente HFHo-1 partía de una situación con una capacidad de producción de citocinas muy disminuida, tanto en respuesta a la ionomicina y PMA como al LPS (tablas 3 y 4). Pues bien, el tratamiento con simvastatina incrementó esta respuesta, tanto en los linfocitos T colaboradores (Th) como en los citolíticos (Tc) (figs. 2 y 3). Hay que señalar que este aumento afectó a todas las citocinas examinadas –IL-2 e IFN- γ –, reflejando una mejoría en la funcionalidad de la respuesta inmunitaria global. Este resultado está en línea con la variedad de efectos inflamatorios y antiinflamatorios que ejerce la simvastatina *in vitro*¹². De todas formas, debemos reconocer las limitaciones del presente estudio en cuanto al número de casos y la extensión del tratamiento, por lo que hay que esperar a poder ampliar estos estudios para extraer conclusiones definitivas.

Agradecimientos

Se agradece la asistencia de Francisca Cerrato en las determinaciones de lípidos y apolipoproteínas, así como los análisis realizados en los Servicios de Bioquímica Clínica y de Hematología del Hospital Ramón y Cajal.

Bibliografía

1. Teruel JL, Lasunción MA, Navarro JF, Carrero P, Ortuño J. Pregnancy in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing low-density lipoprotein apheresis by dextran sulfate adsorption. *Metabolism* 1995;44:929-33.
2. Lasunción MA, Teruel JL, Álvarez JJ, Carrero P, Ortuño J, Gómez-Coronado D. Changes in lipoprotein(a), LDL-cholesterol and apolipoprotein B in homozygous familial hypercholesterolaemic patients treated with dextran sulfate LDL-apheresis. *Eur J Clin Invest* 1993;23:819-26.
3. Schmaldienst S, Banyai S, Stulnig TM, Heinz G, Jansen M, Horl WH, et al. Prospective randomised cross-over comparison of three LDL-apheresis systems in statin pretreated patients with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2000;151:493-9.
4. Bisgaier CL, Essenburg AD, Auerbach BJ, Pape ME, Sekerke CS, Gee A, et al. Attenuation of plasma low density lipoprotein cholesterol by select 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in mice devoid of low density lipoprotein receptors. *J Lipid Res* 1997;38:2502-15.
5. Raal FJ, Pilcher GJ, Illingworth DR, Pappu AS, Stein EA, Laskarzewski P, et al. Expanded-dose simvastatin is effective in homozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1997;135:249-56.
6. Postiglione A, Montefusco S, Paucillo P, Mancini M, Piliago T. Effects of atorvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999;147:423-4.
7. Werner N, Nickenig G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 2002;97:105-16.
8. Bellosa S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 2000;32:164-76.
9. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 2000;6:1399-402.
10. Mach F. Immunosuppressive effects of statins. *Atheroscler Suppl* 2002;3:17-20.
11. Greaves DR, Channon KM. Inflammation and immune responses in atherosclerosis. *Trends Immunol* 2002;23:535-41.
12. Neuhaus O, Strasser-Fuchs S, Fazekas F, Kieseier BC, Niederwieser G, Hartung HP, et al. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS. *Neurology* 2002;59:990-7.
13. Montero MT, Hernández O, Suárez Y, Matilla J, Ferruelo AJ, Martínez-Botas J, et al. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition stimulates caspase-1 activity and Th1-cytokine release in peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis* 2000;153:303-13.
14. Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* 1998;101:1717-25.
15. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1876-90.
16. Pinderski LJ, Fischbein MP, Subbanagounder G, Fishbein MC, Kubo N, Cheroute H, et al. Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Circ Res* 2002;90:1064-71.
17. Martínez-Botas J, Suárez Y, Reshef A, Carrero P, Ortega H, Gómez-Coronado D, et al. Impact of different low-density lipoprotein (LDL) receptor mutations on the ability of LDL to support lymphocyte proliferation. *Metabolism* 1999;48:834-9.
18. Chaves FJ, Real JT, Puig O, Ascaso JF, Teruel JL, Lasunción MA, et al. Hipercolesterolemia familiar: identificación y caracterización molecular del primer homocigoto compuesto español. *Med Clin (Barc)* 1998;110:300-2.
19. Rovers C, Netea MG, De Bont N, Demacker PN, Jacobs C, Kullberg BJ, et al. LPS-induced cytokine production and expression of beta2-integrins and CD14 by peripheral blood mononuclear cells of patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1998;141:99-105.
20. Leirisalo-Repo M, Jaattela M, Gylling H, Miettinen TA, Repo H. Phagocyte function in familial hypercholesterolaemia: peripheral blood monocytes exposed to lipopolysaccharide show increased tumour necrosis factor production. *Scand J Immunol* 1990;32:679-85.
21. De Bont N, Netea MG, Rovers C, Smilde T, Demacker PN, Van der Meer JW, et al. LPS-induced cytokine production and expression of LPS-receptors by peripheral blood mononuclear cells of patients with familial hypercholesterolemia and the effect of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1998;139:147-52.
22. Morschladt MF, Weverling-Rijnsburger AW, De Man FH, Stoecken DJ, Sturk A, Smelt AH, et al. Hyperlipoproteinemia affects cytokine production in whole blood samples ex vivo. The influence of lipid-lowering therapy. *Atherosclerosis* 2000;148:413-9.
23. Netea MG, Demacker PN, De Bont N, Boerman OC, Stalenhoef AF, Van der Meer JW, et al. Hyperlipoproteinemia enhances susceptibility to acute disseminated *Candida albicans* infection in low-density-lipoprotein-receptor-deficient mice. *Infect Immunol* 1997;65:2663-7.

24. Roselaar SE, Daugherty A. Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res* 1998;39:1740-3.
25. De Bont N, Netea MG, Demacker PN, Verschueren I, Kullberg BJ, Van Dijk KW, et al. Apolipoprotein E knock-out mice are highly susceptible to endotoxemia and *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Lipid Res* 1999;40:680-5.
26. Ludewig B, Jaggi M, Dumrese T, Brduscha-Riem K, Odermatt B, Hengartner H, et al. Hypercholesterolemia exacerbates virus-induced immunopathologic liver disease via suppression of antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 2001;166:3369-76.
27. Kiener PA, Davis PM, Murray JL, Youssef S, Rankin BM, Kowala M. Stimulation of inflammatory responses *in vitro* and *in vivo* by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *Int Immunopharmacol* 2001;1:105-18.
28. Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 1997;100:2671-9.
29. Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 2002;420:78-84.
30. Stanislaus R, Gilg AG, Singh AK, Singh I. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rats by Lovastatin. *Neurosci Lett* 2002;333:167-70.
31. Musial J, Undas A, Gajewski P, Jankowski M, Sydor W, Szczeklik A. Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia. *Int J Cardiol* 2001;77:247-53.
32. Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Muller MR, Husslein P, et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1194-9.
33. Deskur-Smielecka E, Wykrtowicz A, Kempa M, Furmaniuk J, Wysocki H. The influence of short-term treatment with simvastatin on the inflammatory profile of patients with hypercholesterolemia. *Coron Artery Dis* 2001;12:143-8.
34. Rosenson RS, Tangney CC, Casey LC. Inhibition of proinflammatory cytokine production by pravastatin. *Lancet* 1999;353:983-4.