

# Inhibidores de la acil coenzima A:colesterol aciltransferasa (ACAT): mecanismos y perspectivas terapéuticas

G. Llaverias y M. Alegret

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

## Introducción

Las enfermedades cardiovasculares continúan siendo la primera causa de muerte en los países industrializados<sup>1</sup>. En los últimos 30 años, diversos estudios epidemiológicos y prospectivos han identificado una serie de factores de riesgo implicados en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis, entre los que destacan los valores elevados de colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) y las bajas concentraciones de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (cHDL)<sup>2</sup>. Las estatinas, inhibidores de la hidroximetil-glutaril CoA reductasa, han demostrado ser muy eficaces para corregir las anomalías del perfil lipídico y reducir la mortalidad asociada<sup>3</sup>. Sin embargo, en un porcentaje elevado de casos no se consigue reducir el cLDL a los valores deseados con estatinas solas<sup>4</sup>, lo que, junto con la preocupación creciente sobre los efectos adversos que pueden derivarse de la combinación de éstas con los fibratos, hace muy necesaria la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas. Por otra parte, resulta evidente que el tratamiento y la prevención de la enfermedad aterosclerótica debe implicar no sólo la corrección de los factores de riesgo, sino también el control farmacológico directo de los procesos que tienen lugar dentro de la propia pared arterial. Entre es-

tos procesos, resulta fundamental la acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos y las células musculares lisas, mediada por la enzima acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT)<sup>5</sup>, cuya inhibición constituye una interesante diana terapéutica, ya que limitaría el desarrollo de la placa de ateroma; además, debido a la participación de la ACAT en el ensamblaje de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)<sup>6</sup>, los inhibidores de la ACAT tendrían efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico. Por todo ello, este grupo de fármacos es uno de los más prometedores entre las nuevas opciones terapéuticas para la reducción del riesgo cardiovascular que se investigan en la actualidad<sup>7,8</sup>.

## ACAT

La ACAT (EC 2.3.2.26) cataliza la formación de ésteres de colesterol a partir de colesterol libre y acil-CoA, procedentes de ácidos grasos de larga cadena. La actividad ACAT está implicada en diversos procesos fisiológicos (fig. 1): en primer lugar, es necesaria para el almacenamiento de ésteres de colesterol en el citoplasma celular. Aunque la esterificación es un proceso destinado a evitar un exceso de colesterol libre, que resultaría tóxico para la célula, la acumulación de ésteres de colesterol en macrófagos y células musculares lisas conduce a la formación de células espumosas, un proceso clave en el desarrollo de estrías grasas y de la placa aterosclerótica<sup>5</sup>.

En segundo lugar, la formación de ésteres de colesterol por acción de la ACAT está implicada en el ensamblaje y la secreción de lipoproteínas que contienen apolipoproteína (Apo) B<sup>9</sup>. La síntesis de

Correspondencia: Dra. M. Alegret.

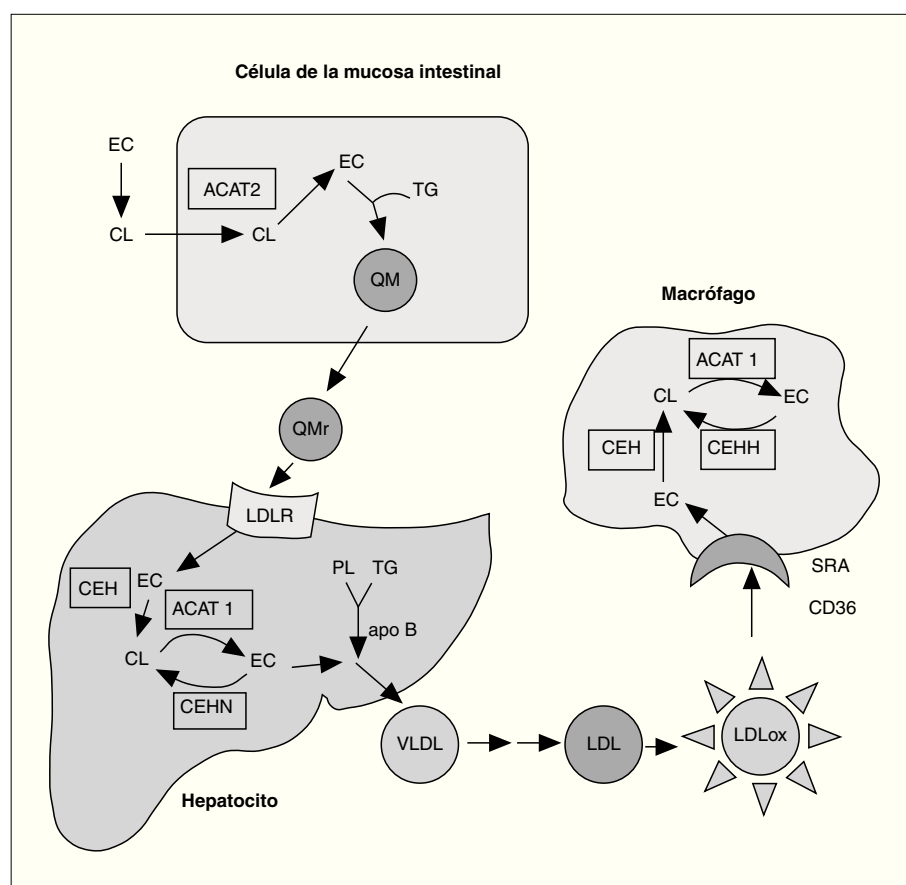
Unidad de Farmacología y Farmacognosia. Facultad de Farmacia.

Avda. Diagonal, 643. 08028 Barcelona. España.

Correo electrónico: alegret@farmacia.far.ub.es

Recibido y aceptado el 5 de junio de 2003.

**Figura 1.** Funciones de la enzima acil coenzima A:colesterol aciltransferasa (ACAT) en células de la mucosa intestinal, hepatocitos y macrófagos humanos. El colesterol procedente de la dieta se absorbe en forma libre (CL), pero en el interior de las células intestinales se reesterifica por acción de la ACAT2. Los ésteres de colesterol formados (EC) se ensamblan con triglicéridos (TG) para formar los quilomicrones (QM), que son exportados. Tras su degradación por la lipoproteín lipasa, los QM remanentes (QMr) son captados por las células hepáticas a través de receptores como el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (LDLR). En el hepatocito, los EC son hidrolizados por la hidrolasa de ésteres de colesterol lisosomal (CEH), formándose de nuevo CL. Éste es reesterificado por la ACAT (en el hígado humano la isoforma mayoritaria es la ACAT1), y se forman EC, que se ensamblan con fosfolípidos (PL), TG y apolipoproteína (Apo) B, originando las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Una vez secretadas, éstas se transforman en LDL, que, después de experimentar modificaciones oxidativas (LDLox), pueden ser captadas por receptores *scavenger* del macrófago (SRA, CD36). Una vez en el interior del macrófago, los EC que aportan las LDLox se hidrolizan por la CEH y originan CL. Para evitar la acumulación de CL, que es citotóxico, éste es de nuevo esterificado y almacenado en el citosol en forma de EC. En el interior de los macrófagos y los hepatocitos, el colesterol entra en un ciclo de esterificación/hidrólisis, procesos catalizados por la ACAT y por la hidrolasa neutra de EC (CEHN), conocido como "ciclo de los ésteres de colesterol".



VLDL implica la asociación de ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos con Apo B, gracias a la acción facilitadora de la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP). Un aporte insuficiente de lípidos provocaría la degradación de la Apo B y, como consecuencia, un bloqueo del ensamblaje y secreción de VLDL<sup>10</sup>.

Finalmente, en el intestino delgado, la ACAT desempeña un papel importante en la absorción de colesterol de la dieta<sup>6</sup>. Aunque el colesterol se absorbe en forma no esterificada, una vez en el interior de las células de la mucosa intestinal, se produce la reesterificación de la molécula, lo que permite la incorporación de los ésteres de colesterol en los quilomicrones. Por tanto, la acción de la ACAT en las células intestinales crea un gradiente que favorece la difusión de colesterol libre a través de la membrana del enterocito<sup>11</sup>.

La actividad ACAT puede ser regulada por diversos mecanismos: disponibilidad de sustrato, activación/inactivación, efectos viscotrópicos y modificaciones en la cantidad de enzima<sup>12</sup>. El primero de estos mecanismos, la regulación por colesterol, se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*. Así, en fibroblastos humanos y células CHO, la actividad ACAT resulta estimulada tras la adición de LDL o de 25-hidroxicolesterol, por un mecanismo que no implica un aumento de la síntesis proteica<sup>13-15</sup>. De igual modo, en animales de experimentación alimentados con dietas ricas en colesterol, se observan aumentos en la velocidad de síntesis de ésteres de colesterol y en la actividad ACAT<sup>16</sup>. Parece ser que la regulación de la actividad ACAT por sustrato se produce principalmente por un mecanismo alostérico<sup>17</sup> y no transcripcional, ya que en el promotor del gen correspondiente no se

han identificado elementos de respuesta a esteroides<sup>18</sup>.

Después de diversos intentos fallidos de purificar la enzima, en 1993 se clonó por primera vez el gen de la ACAT humana<sup>19</sup>. Tan sólo 3 años después, se obtuvieron ratones deficientes en este gen<sup>20</sup>. A partir del estudio de estos animales se lograron conclusiones sorprendentes. Así, aunque los ratones ACAT<sup>-/-</sup> presentaban una marcada disminución en la capacidad de esterificar colesterol en macrófagos peritoneales, fibroblastos y glándulas adrenales, la absorción intestinal de colesterol y la actividad ACAT hepática eran normales. Estos hallazgos fueron uno de los primeros indicios de que podían existir distintos subtipos de ACAT. La confirmación de estas sospechas llegó en 1998, cuando 3 grupos distintos anunciaron la clonación de un segundo gen, denominado ACAT2<sup>21-23</sup>, mientras que el gen originalmente clonado por Chang et al en 1993 pasó a denominarse ACAT1. La secuencia de la ACAT2 presenta muy pocas similitudes con la ACAT1 en los primeros 100 aminoácidos del extremo aminoterminal, pero el resto de la secuencia presenta una homología del 60%<sup>21</sup>. Ambas son proteínas integrales de membrana, presentan múltiples dominios transmembrana, y se localizan mayoritariamente en el retículo endoplasmático<sup>24</sup>. Sin embargo, parece ser que la orientación en la membrana difiere para cada isoforma. Así, la ACAT1 presenta el extremo aminoterminal, donde se sitúa el residuo catalíticamente activo, localizado en el citosol y el extremo carboxiterminal orientado hacia el lumen del retículo endoplasmático<sup>25</sup>. En cambio, el residuo de serina necesario para la actividad del enzima ACAT2 (Ser<sub>249</sub>) está localizado en la parte luminal del retículo endoplasmático<sup>26</sup>.

También hay claras diferencias respecto a la distribución tisular. ACAT1 es ubicua, se ha hallado en la mayoría de tipos celulares estudiados, y presenta los mayores valores de expresión en adrenales, macrófagos y glándulas sebáceas<sup>27</sup>. Es interesante destacar que esta isoforma también se expresa en lesiones ateroscleróticas humanas, principalmente en células espumosas derivadas de macrófagos<sup>28</sup>. En cambio, la expresión de la ACAT2 se encuentra restringida al intestino delgado y al hígado; así, tanto en humanos como en primates y en ratón, ACAT2 es la principal isoforma en células del intestino delgado<sup>27,29,30</sup>. La expresión de las 2 isoformas de la ACAT en células hepáticas es variable, según la especie. En ratón y primates no humanos, ACAT2 es la isoenzima mayoritaria, mientras que en hepatocitos humanos adultos ACAT1 es la principal isoforma<sup>27</sup>.

La distinta topología y distribución celular que presentan ACAT1 y ACAT2 favorece la hipótesis de que cada isoforma evolucionó para realizar funciones distintas en la célula (fig. 2). Según este modelo<sup>26,27</sup>, la ACAT1, cuyo centro activo está orientado hacia el citosol, actuaría principalmente en la síntesis de ésteres de colesterol que serían almacenados en forma de gotículas lipídicas citosólicas. Así, en macrófagos humanos, donde la ACAT1 es la principal isoforma, esta enzima desempeña un importante papel en la acumulación de ésteres de colesterol y en la formación de células espumosas. En cambio, la función de la ACAT2, expresada principalmente en células intestinales y hepáticas, se relacionaría con la producción de ésteres de colesterol destinados al ensamblaje de lipoproteínas que contienen Apo B. Un modelo quizá más realista es el propuesto por Chang et al<sup>18</sup>, según el que ACAT1 y ACAT2 actuarían de forma concertada en el ensamblaje y síntesis de quilomicrones y VLDL.

### Mecanismos de acción de los inhibidores de la ACAT. Estudios en ratones deficientes en ACAT

El papel fundamental de la actividad ACAT, en los diversos procesos fisiológicos anteriormente mencionados, ha impulsado la búsqueda de agentes capaces de inhibir esta actividad enzimática, que podrían actuar en 3 lugares diferentes (fig. 3)<sup>31</sup>:

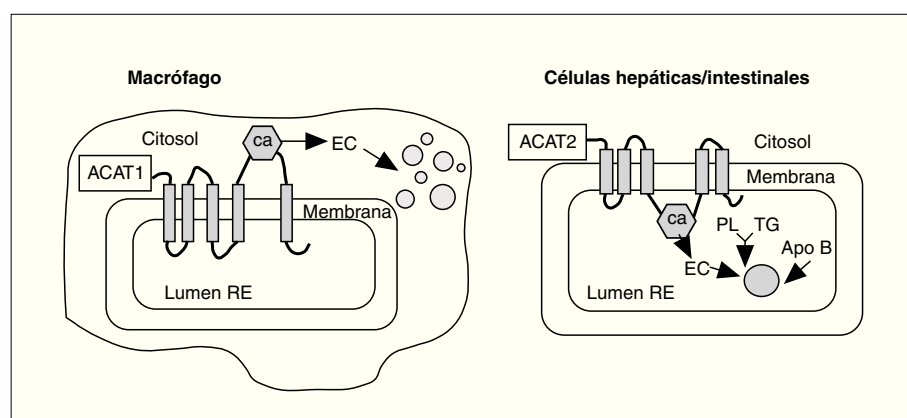
1. En el intestino, donde impedirían la correcta absorción del colesterol de la dieta.

2. En el hígado, donde reducirían la síntesis de VLDL, posiblemente mediante una reducción en la secreción de Apo B. Por otro lado, la inhibición de la ACAT hepática favorecería la eliminación de colesterol al aumentar el *pool* de colesterol libre que puede ser excretado en la bilis, directamente o tras su conversión en ácidos biliares.

3. En las células de la pared arterial, la inhibición de la ACAT impediría la acumulación de ésteres de colesterol y, por tanto, reduciría la formación de células espumosas. A diferencia de los anteriores, este mecanismo constituiría un efecto antiaterosclerótico directo, independiente de la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol. Por otra parte, existen evidencias que sugieren que la inhibición de la ACAT podría favorecer la eliminación de colesterol del macrófago, ya que aumentaría la disponibilidad de colesterol libre que podría vehiculizarse hacia las HDL<sup>32</sup>.

La mayoría de los fármacos inhibidores de la ACAT que existen en la actualidad actúan de forma no selectiva sobre las 2 isoenzimas<sup>27</sup>. Sin embargo, la distinta expresión tisular de ACAT1 y ACAT2 fomentó la teoría de que la inhibición se-

**Figura 2.** Modelo de topología de membrana propuesto para ACAT1 y ACAT<sup>26,27</sup>. Ambas isoformas son proteínas con varios dominios transmembrana, localizadas en el retículo endoplasmático (RE). La ACAT1 presenta el centro activo (ca) orientado hacia el citosol, por lo que su principal función sería la síntesis de ésteres de colesterol (EC) para su almacenamiento en forma de gotículas citosólicas. En macrófagos humanos, donde la ACAT1 es la principal isoforma, la acumulación de EC favorece la formación de células espumosas. La ACAT2 presenta el residuo catalíticamente activo (ca) en la cara luminal del RE, por lo que la función propuesta para esta isoenzima sería la producción de EC destinados a la formación de lipoproteínas (quilomicrones [QM] o lipoproteínas de muy baja densidad [VLDL]).



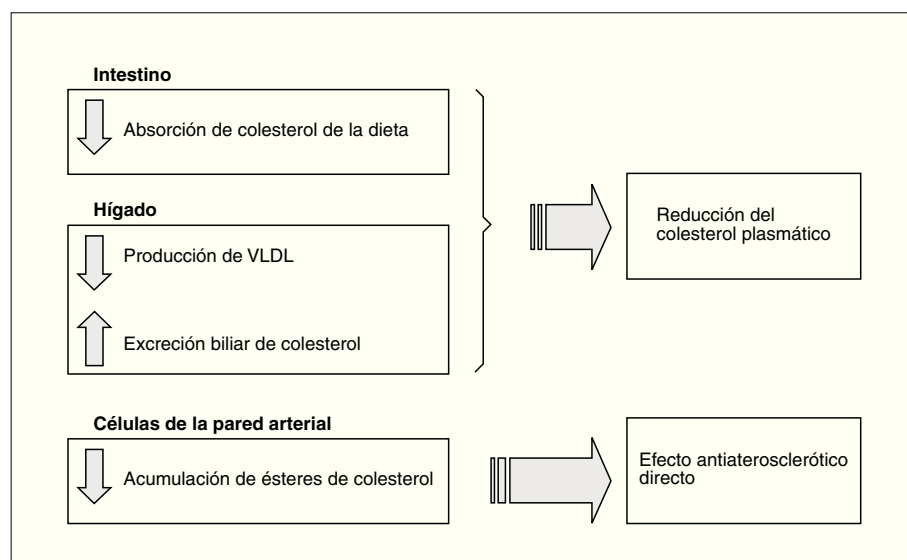
lectiva de la ACAT1 en macrófagos reduciría la formación de lesiones ateroscleróticas y, por tanto, se consideró que el desarrollo de inhibidores selectivos de esta isoforma tendría una gran importancia terapéutica.

Con el fin de investigar el valor potencial de la inhibición de la ACAT1, se cruzaron ratones deficientes en esta isoenzima con ratones susceptibles al desarrollo de aterosclerosis (deficientes en Apo E o en el receptor de LDL)<sup>33,34</sup>. Los resultados obtenidos en estos animales doble *knockout* fueron bastante decepcionantes, pues se evidenció que la deficiencia de ACAT1 no evita el desarrollo de lesiones ateroscleróticas; únicamente en el estudio de Yag-

yu et al<sup>33</sup> se observó reducción en el área de la lesión en uno de los modelos (ACAT1<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup>).

En ambos modelos, la deficiencia sistémica en ACAT1 causa una reducción relativa de los valores plasmáticos de colesterol, lo que dificulta la determinación del efecto específico de la ausencia de este gen sobre el desarrollo de la lesión<sup>34</sup>. En un elegante experimento en el que se pretendía eliminar efectos debidos a la deficiencia de ACAT1 en otros tipos celulares, Fazio et al<sup>35</sup> transplantaron macrófagos ACAT1<sup>-/-</sup> en ratones LDLR<sup>-/-</sup>. De forma sorprendente, en este modelo el proceso aterosclerótico no sólo no se inhibió, sino que incluso resultó acelerado.

**Figura 3.** Posibles mecanismos de acción de los inhibidores de la ACAT. La reducción de la absorción intestinal de colesterol, junto con la disminución en la síntesis hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y la aceleración de la excreción de colesterol en la bilis (como tal o tras su conversión en ácidos biliares), originan una reducción de los valores plasmáticos de colesterol, lo que corresponde a una acción antiaterosclerótica indirecta. En cambio, la inhibición de la acumulación de colesterol en células de la pared arterial, como los macrófagos, supone un efecto antiaterosclerótico directo.



A partir de los estudios anteriores, puede concluirse que la deficiencia en ACAT1 no evita el desarrollo de lesiones ateroscleróticas; sin embargo, se observaron ciertas alteraciones en su composición que pueden resultar beneficiosas: así, las lesiones desarrolladas en ambos modelos doble *knockout* (ACAT1<sup>-/-</sup>/LDLR<sup>-/-</sup> y ACAT1<sup>-/-</sup>/Apo E<sup>-/-</sup>) contenían menos lípidos de tipo neutro y menos macrófagos, por lo que se puede suponer que las placas formadas serían más estables<sup>34</sup>.

Aparte de los efectos sobre el desarrollo y la composición de las lesiones, la deficiencia de ACAT1 en ratones hiperlipémicos produce una excesiva deposición de colesterol libre en la piel, xantomatosis masiva y depósitos de colesterol cristalizado en el cerebro<sup>33,34</sup>. De acuerdo con estos resultados, puede afirmarse que una inhibición completa de la actividad ACAT1 en una situación de hiperlipemia grave produciría probablemente efectos tóxicos graves. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los resultados obtenidos en animales en los que existe total ausencia del enzima ACAT1, únicamente serían asimilables al tratamiento con inhibidores selectivos de la ACAT1 en el caso de que éstos se utilizaran a dosis extremadamente altas. Por otra parte, la distribución de las isoenzimas ACAT1/ACAT2 en ratones y humanos es diferente, por lo que los efectos tóxicos observados en ratones ACAT1<sup>-/-</sup> podrían ser específicos para esta especie<sup>18</sup>.

Recientemente, se han obtenido ratones deficientes en ACAT2<sup>36</sup>. Estos animales carecen de actividad ACAT en el hígado y el intestino, lo que se traduce en una resistencia a la hipercolesterolemia y a la formación de cálculos biliares cuando se someten a una dieta rica en colesterol. La utilización de un inhibidor selectivo de la ACAT2 debería reducir la absorción de colesterol de la dieta, ya que en humanos, al igual que en el ratón, la isoforma mayoritaria en las células intestinales es la ACAT2. Sin embargo, debido a que en el hígado humano la principal isoenzima es la ACAT1, probablemente resultaría más beneficioso un agente capaz de inhibir ambas isoformas, pues la inhibición de la ACAT1 hepática aumentaría la síntesis de ácidos biliares y reduciría la formación de cálculos, a la vez que la inhibición de la ACAT2 intestinal reduciría la absorción de colesterol<sup>18</sup>.

En un interesante trabajo, Perrey et al<sup>37</sup> desarrollaron una serie de inhibidores de la ACAT con buena biodisponibilidad, que presentaban una CI<sub>50</sub> menor para la ACAT del macrófago en relación con la ACAT hepática o intestinal. Estos compuestos se administraron a modelos animales de hipercoleste-

roleemia, como el ratón deficiente en Apo E o el conejo KHC, deficiente en el receptor de LDL. Los resultados de este estudio demostraron que la inhibición preferente de la ACAT del macrófago no sólo no reduce la formación de la placa, sino que incluso puede aumentar sus índices de progresión. Estos efectos negativos parecen estar relacionados, según los autores, con los efectos citotóxicos que produce el incremento de colesterol libre en el macrófago, en ausencia de un sistema de transporte reverso de colesterol eficiente.

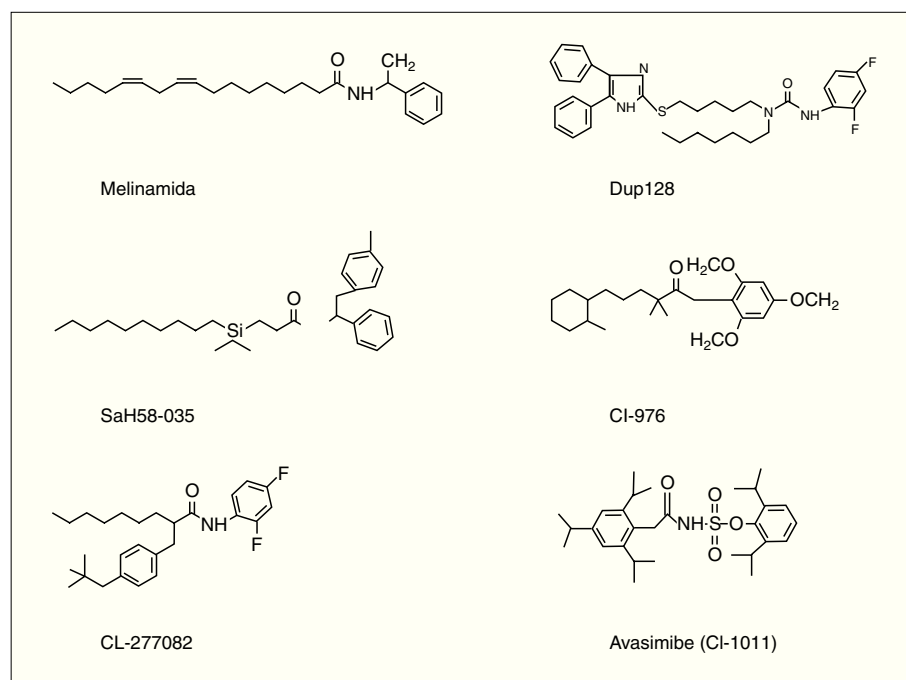
En conclusión, la utilización de inhibidores selectivos o la ablación completa de la actividad ACAT no resulta potencialmente útil desde el punto de vista de la reducción de las lesiones ateroscleróticas, e incluso puede resultar contraproducente en una situación de hiperlipemia. En cambio, la inhibición parcial de la ACAT mediante fármacos que no actúen de forma selectiva podría producir efectos antiaterogénicos, sin originar efectos adversos significativos. La evolución, características e interés farmacológico de estos inhibidores se revisarán a continuación.

### Desarrollo de fármacos inhibidores de la ACAT

Los primeros intentos de sintetizar fármacos inhibidores de la ACAT se dirigieron hacia la búsqueda de moléculas poco absorbibles, que actuaran localmente, bloqueando la absorción intestinal de colesterol<sup>38</sup>. Con este fin, se desarrollaron amidas de ácidos grasos, que mimetizan uno de los sustratos de la enzima. Dentro de este grupo pueden citarse la melinamida<sup>39</sup>, el octimbate<sup>40</sup> y los compuestos SaH57-118<sup>41</sup> y SaH58-035<sup>42</sup> (fig. 4). La melinamida es un inhibidor no competitivo de la ACAT, único comercializado hasta el momento, en Japón, con el nombre de Artes®. El tratamiento de pacientes hipercolesterolémicos con melinamida a la dosis de 2,25 g/día durante 1 año produjo reducciones más bien modestas (20%) en los valores de colesterol plasmático<sup>38</sup>. También a principios de la década de los ochenta, Sandoz desarrolló una serie de amidas del ácido oleico, como SaH57-118, de potencia similar a la melinamida, y SaH58-035, que presentaba mayor potencia. Estos 2 últimos agentes fueron estudiados en ensayos clínicos de fase I, pero su desarrollo se abandonó antes de que su eficacia clínica fuera evaluada<sup>38</sup>.

Otro tipo de inhibidores de la ACAT son las ureas di- o tri-sustituidas, como el compuesto CL-277082 (fig. 4). Este agente, de elevada potencia (CI<sub>50</sub> de 0,14 µM en microsomas intestinales de rata), es capaz de inhibir la absorción intestinal de colesterol en ratas alimentadas con dietas ricas en colesterol<sup>43</sup> y de reducir los valores plasmáticos

Figura 4. Estructuras químicas de agentes inhibidores de la ACAT.



de colesterol en conejos alimentados con caseína<sup>6</sup>. Sin embargo, no resultó efectivo en voluntarios sanos alimentados con una dieta americana típica<sup>44</sup>.

Igualmente, el diarilimidazol Dup128 (fig. 4), que había resultado eficaz reduciendo la hipercolesterolemia de origen dietético en hámsteres, conejos y monos, tuvo un efecto muy escaso cuando se administró a voluntarios sanos<sup>45</sup>: la absorción intestinal de colesterol disminuyó un 17% a la dosis más alta, y la reducción en el colesterol total plasmático fue sólo de un 3,9%.

Estos resultados pusieron de manifiesto que existían marcadas diferencias en la respuesta a los inhibidores de la ACAT entre los animales alimentados con dietas ricas en colesterol y los voluntarios normolipidémicos. La inhibición de la ACAT intestinal no parecía, por tanto, una buena diana terapéutica para la reducción del colesterol plasmático en humanos<sup>38</sup>.

Sin embargo, a pesar de estos resultados tan decepcionantes, se continuó con la búsqueda de moléculas con buena biodisponibilidad que actuaran directamente en el hígado o en las células de la pared vascular. Ya en la década de los noventa, Warner-Lambert sintetizó un derivado del ácido decaínoico muy potente como inhibidor de la ACAT, el compuesto CI-976 (fig. 4). La administración de CI-976 no sólo bloqueó la progresión de lesiones ateroscleróticas producidas por la dieta hipercoles-

terolémica en conejos, sino que causó la regresión de lesiones inducidas por denudación del endotelio, comparables a las estrías grasas humanas<sup>46</sup>; además, dichos efectos se observaron a dosis a las que CI-976 no modificaba los valores plasmáticos de colesterol, por lo que se concluyó que este agente producía una inhibición directa de la actividad ACAT en la pared arterial.

Además de CI-976, otras moléculas con buena biodisponibilidad sistémica demostraron ser eficaces en modelos animales de aterosclerosis<sup>38</sup>, pero algunas de ellas resultaron ser tóxicas en el tejido adrenal. Así, los compuestos PD-132301-2<sup>47</sup> y FR-14237<sup>48</sup> inducían degeneración adrenocortical en animales de experimentación. La toxicidad adrenal no parece consecuencia directa de la inhibición de la actividad ACAT, y se atribuye a fenómenos como la inhibición de la respiración mitocondrial<sup>47</sup> o la acumulación de colesterol libre<sup>49</sup>.

Para intentar evitar estos efectos tóxicos, se desarrollaron inhibidores más hidrosolubles, ya que, teóricamente, éstos tendrían menor tendencia a acumularse en las adrenales. De este modo, se identificó una estructura química que parecía impedir la toxicidad adrenal: la presencia de un grupo fenil en el carbono adyacente al carbonil de la amida<sup>38</sup>. Entre estas moléculas se halla el compuesto CI-1011<sup>50</sup> (fig. 4), sintetizado originalmente por Parke-Davis (Warner-Lambert), actualmente inte-

grada en Pfizer Global Research and Development. Este compuesto, denominado avasimibe, es el inhibidor de la ACAT que se halla en una fase más avanzada de estudios clínicos (fase III)<sup>51</sup> y, por ello, merece un comentario más detallado.

### **Avasimibe (tabla 1)**

#### *Efectos en macrófagos y células espumosas*

El efecto del avasimibe sobre la formación de células espumosas se ha estudiado *in vitro* en macrófagos THP-1<sup>52</sup> y en cultivo primario de macrófagos derivados de monocitos humanos<sup>53</sup>. Los resultados de un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, en células THP-1<sup>52</sup>, mostraron que el avasimibe (0-0,2  $\mu$ M) no reduce la acumulación intracelular de colesterol en células espumosas preestablecidas; esta falta de efecto ya se había descrito para otros inhibidores de la ACAT<sup>54,55</sup>. Por el contrario, Rodríguez et al<sup>53</sup> observaron una reducción del 68% en los valores de ésteres de colesterol en macrófagos humanos primarios previamente convertidos en células espumosas. La discrepancia entre estos resultados podría atribuirse, aparte de diferencias en el modelo celular utilizado, al uso de una dosis muy superior de avasimibe, aproximadamente 4  $\mu$ M, en el estudio de Rodríguez et al<sup>53</sup>.

A diferencia de lo que sucede en células espumosas, la adición de avasimibe durante el proceso de carga lipídica (incubación simultánea con el fármaco y LDL modificadas por acetilación) produjo una disminución dependiente de la concentración en el contenido de ésteres de colesterol de macrófagos THP-1, que alcanzó un 70% a 0,2  $\mu$ M de avasimibe<sup>52</sup>. Este efecto no se acompañó de un incremento en el contenido intracelular de colesterol libre; en este mismo sentido, en ratones tratados con avasimibe se observa una reducción en el número de lesiones que contienen acumulaciones de colesterol libre<sup>56</sup>. Teniendo en cuenta la citotoxicidad que deriva de la acumulación de colesterol libre en macrófagos<sup>37,49,57</sup>, los resultados anteriores sugieren un mejor perfil de seguridad para el avasimibe, en comparación con otros inhibidores de la ACAT<sup>51</sup>.

#### *Efectos sobre la síntesis y secreción de apolipoproteína B*

El estudio de los efectos de los inhibidores de la ACAT sobre la secreción de Apo B y de VLDL *in vitro* ha ofrecido resultados inconsistentes<sup>58-63</sup>. En el caso del avasimibe, Wilcox et al<sup>64</sup> evidenciaron que la incubación de células de hepatoma humano (HepG2) con este fármaco reducía de forma dependiente de la dosis la secreción de Apo B-100. De

forma similar, el tratamiento de minicerdos con avasimibe produjo una disminución significativa en la secreción de Apo B y de apoproteínas que contienen Apo B al plasma, sin que su catabolismo resultara alterado<sup>65</sup>. Resulta lógico deducir que este efecto estaría relacionado con la reducción en la cantidad de ésteres de colesterol disponibles para ensamblarse con la Apo B, lo que aumentaría la degradación intracelular de esta apoproteína y disminuiría la producción hepática de VLDL. Sin embargo, en el estudio de Wilcox et al<sup>64</sup>, el inhibidor de la ACAT Dup128 no disminuyó la secreción de Apo B a pesar de reducir, incluso más intensamente que el avasimibe, el contenido intracelular de ésteres de colesterol. Las razones para esta diferencia de comportamiento no están claras, aunque los autores del estudio apuntan la posibilidad de que existan distintos *pools* de ésteres de colesterol regulados de forma independiente. Alternativamente, se ha sugerido que el avasimibe podría presentar mayor potencia como inhibidor de la ACAT<sup>29</sup>, aunque, por el momento, no hay evidencias al respecto.

Por otra parte, la inhibición de la ACAT hepática no parece afectar la expresión o la funcionalidad del receptor de LDL, ya que ni la abundancia de ARNm de este receptor ni el catabolismo de VLDL o LDL resultan modificados<sup>65</sup>.

#### *Efectos sobre la síntesis de ácidos biliares*

En hepatocitos de rata, el avasimibe produce un incremento de alrededor de 3 veces en la síntesis total de ácidos biliares<sup>66</sup>, un efecto que también ha sido descrito para otros inhibidores de la ACAT<sup>67-69</sup>. El incremento en la síntesis de ácidos biliares producido por el avasimibe parece estar relacionado con el aumento en la expresión y actividad del enzima colesterol 7- $\alpha$ -hidroxilasa<sup>66</sup>. También *in vivo*, el tratamiento de ratas hipercolesterolémicas con avasimibe incrementó los valores de ARNm y la actividad de la colesterol 7- $\alpha$ -hidroxilasa. Probablemente ello se deba a que la inhibición de la ACAT aumenta la cantidad de colesterol libre, que actúa a la vez como sustrato y como inductor de dicha enzima. Resulta interesante también que en estos animales no se observaron modificaciones en la relación colesterol/ácidos biliares de la bilis, lo que indica que el avasimibe no incrementa el índice litogénico de ésta<sup>66</sup>.

#### *Reducción de los valores de lípidos plasmáticos y de lipoproteína (a)*

El efecto hipocolesterolemizante de avasimibe se ha confirmado en diversos modelos animales<sup>51</sup>. En animales tratados con dietas enriquecidas en colesterol, las reducciones en los valores de colesterol

**Tabla 1. Efectos farmacológicos del avasimibe**

| Efectos  | Referencias bibliográficas   |
|--|--|
| Reducción de la acumulación de CE en macrófagos                  | Llaverias et al <sup>52</sup> , Rodríguez y Usher <sup>53</sup>  |
| Reducción de la secreción de Apo B/lipoproteínas                 | Wilcox et al <sup>64</sup> , Burnett et al <sup>65</sup>   |
| Aumento de la síntesis ácidos biliares                           | Post et al <sup>66</sup>   |
| Reducción de los valores de colesterol/triglicéridos plasmáticos | Lee et al <sup>50</sup> , Delsing et al <sup>56</sup> , Burnett et al <sup>65</sup> , Post et al <sup>66</sup> , Nicolosi et al <sup>70</sup> , Ramharack et al <sup>71</sup> , Insull et al <sup>84</sup> |
| Reducción de los valores de Lp(a)                                | Ramharack et al <sup>71</sup>  |
| Inhibición de metaloproteinasas                                  | Bocan et al <sup>77</sup>  |
| Reducción formación/progresión lesiones ateroscleróticas         | Delsing et al <sup>56</sup> , Nicolosi et al <sup>70</sup> , Bocan et al <sup>77</sup> , Bocan et al <sup>78</sup>   |

total plasmático se producen por disminución del cLDL y colesterol ligado a VLDL<sup>56,66,70</sup>. La eficacia del avasimibe no se atribuye a la inhibición de la ACAT intestinal, ya que en estos modelos la ACAT hepática es el principal determinante de la concentración de colesterol plasmático<sup>70</sup>. Sin embargo, los animales alimentados con este tipo de dietas resultan cuestionables como modelos para evaluar la eficacia clínica de los inhibidores de la ACAT; el avasimibe resultó ser igualmente eficaz, en cuanto a la reducción del colesterol plasmático, en otro tipo de modelos, como la rata alimentada con dieta estándar o el conejo alimentado con una dieta enriquecida en caseína<sup>50</sup>.

Además de su efecto hipocolesterolemante, el tratamiento con avasimibe u otros inhibidores de la ACAT también produce reducciones en los valores de triglicéridos en modelos animales alimentados o no con dietas ricas en colesterol<sup>50,66,70</sup>. Este efecto se atribuye, sobre todo, a la reducción en la producción de VLDL, principales lipoproteínas transportadoras de estos lípidos.

El tratamiento de primates con avasimibe también produce marcadas reducciones en los valores plasmáticos de lipoproteína (a) (Lp[a]), posiblemente por el aumento de su catabolismo y/o la disminución de su producción<sup>71</sup>. Este último mecanismo se relaciona con una reducción de los valores de Apo (a), y parece ser independiente de las reducciones en la producción de Apo B-100<sup>71</sup>. Aunque este efecto no se ha descrito hasta el momento para otros inhibidores de la ACAT, la singularidad estructural del avasimibe puede conferir capacidad a esta molécula para ejercer funciones adicionales, como la reducción de Lp(a). El papel de esta lipoproteína como factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular sugiere que los fármacos capaces de reducir sus valores podrían ser útiles terapéuticamente. Si esto se confirma, el avasimibe podría convertirse en un modelo para el desarrollo de agentes más potentes y específicos como inhibidores de la Lp(a).

### *Eficacia del avasimibe en la prevención/regresión de lesiones ateroscleróticas*

Diversos estudios en animales de experimentación han demostrado la capacidad de los inhibidores de la ACAT para reducir el desarrollo de lesiones ateroscleróticas<sup>46,70,72-81</sup>. En algunos de estos estudios<sup>70,74,81</sup>, la acción antiaterosclerótica parece ser de tipo indirecto, pues está relacionada con las propiedades hipocolesterolemiantes del fármaco en cuestión. Para determinar si el avasimibe producía efectos antiateroscleróticos independientes de la reducción del colesterol plasmático, se diseñó un estudio en ratones Apo E<sup>-3</sup>-Leiden<sup>56</sup>, cuyos valores de colesterol plasmático pueden modularse en función de la cantidad de colesterol de la dieta. En comparación con el grupo control, que presentaba hipercolesterolemia muy marcada, el tratamiento con avasimibe produjo una reducción del 56% en el colesterol plasmático y del 92% en el área de la lesión. Cuando se comparó con un grupo control, cuyos valores de colesterol en plasma se ajustaron a valores similares a los del grupo tratado con avasimibe, el efecto del fármaco sobre el área de la lesión, que se redujo un 73%, continuó siendo muy significativo. Estos resultados confirmaron que, aparte de su efecto hipocolesterolemante, el avasimibe ejerce acciones antiateroscleróticas directas. Además, la composición de las lesiones en cada grupo sugiere que el tratamiento con avasimibe puede contribuir a incrementar la estabilidad de la placa aterosclerótica, ya que reduce la acumulación de lípidos en la pared arterial, el número de células espumosas de la lesión y la infiltración de macrófagos en la media<sup>56</sup>. En este mismo sentido, la inhibición de la actividad de las metaloproteinasas observada en conejos hipercolesterolémicos tratados con avasimibe<sup>77</sup> también indica un potencial efecto de estabilización de lesiones preestablecidas. La reducción de la actividad de las metaloproteinasas sería consecuencia de la reducción en la acumulación de macrófagos inducida por el tratamiento, ya que experimentos *in vitro* en macrófa-



gos humanos indican que el avasimibe no ejerce efectos directos sobre la actividad de estas enzimas<sup>77</sup>.

La reducción de las lesiones ateroscleróticas, observada histológicamente en los estudios anteriormente mencionados, parece traducirse en una mejora de la función vascular. Así, en conejos con hipercolesterolemia de origen dietético, se ha demostrado que el avasimibe es capaz de reducir la generación de radicales libres y mejorar la relajación vascular dependiente del endotelio<sup>82</sup>.

### *Combinación con estatinas*

Con independencia de sus efectos hipocolesterolemiantes, las estatinas pueden interferir directamente en el desarrollo del proceso aterosclerótico. Teóricamente, por tanto, la inhibición concomitante de la ACAT y de la hidroximetil glutaril-CoA reductasa potenciaría tanto las propiedades hipolipemiantes como los efectos antiateroscleróticos directos de ambos agentes en la pared arterial. Por ello, diversos autores han estudiado los efectos de la combinación de estatinas e inhibidores de la ACAT en modelos animales *in vivo*<sup>76,78,83</sup>. La coadministración de CI-976 y atorvastatina en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol produjo una reducción mayor en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas, en comparación con animales tratados con uno de los fármacos de forma individual<sup>76</sup>; esta mayor efectividad se atribuyó, principalmente, a una reducción más intensa en los valores plasmáticos de colesterol. De forma similar, en conejos alimentados con caseína, la combinación del inhibidor de la ACAT F12511 con atorvastatina disminuyó más marcadamente la concentración plasmática de colesterol que cada uno de estos agentes por separado<sup>83</sup>. Con el objetivo de delimitar los efectos atribuibles a la reducción del colesterol, Bocan et al<sup>78</sup> diseñaron un estudio en el que las concentraciones de colesterol plasmático de los animales se normalizaron antes del tratamiento. En relación con un control de progresión de la lesión, la combinación de avasimibe y simvastatina, a pesar de reducir el colesterol de forma similar a los grupos tratados con los fármacos por separado, produjo reducciones más profundas en la extensión de las lesiones. Cuando se compararon con controles a tiempo cero (animales sacrificados antes de iniciar el tratamiento), la combinación también resultó ser más efectiva, por cuanto redujo un 64% el tamaño de la lesión (mientras que los fármacos por separado no modificaron este parámetro) y la reducción en el área de monocitos-macrófagos fue mayor (el 73 frente al 50%). A partir de estos resultados, los autores con-

cluyeron que el avasimibe, combinado con la simvastatina, no sólo inhibe la progresión de la lesión, sino que incluso induce la regresión de lesiones ya existentes, con independencia de los efectos sobre el colesterol plasmático.

El efecto beneficioso de la combinación de inhibidores de la ACAT y estatinas sobre la regresión de las lesiones ateroscleróticas también se ha podido observar por métodos no invasivos, como el análisis por resonancia magnética; los resultados obtenidos mediante esta técnica muestran una excelente correlación con parámetros más clásicos como la evaluación histopatológica de las lesiones<sup>32</sup>. Estos resultados confirmarían el gran potencial de la utilización conjunta de inhibidores de la ACAT y de la HMG-CoA reductasa en la prevención del desarrollo de la aterosclerosis.

Nuestro grupo de investigación se ha interesado por profundizar en los efectos de la combinación de avasimibe y atorvastatina en cultivo de macrófagos humanos<sup>52</sup>. En nuestro modelo, la inclusión de atorvastatina 5 µM aumentó unas 2 veces la capacidad de avasimibe de reducir los valores intracelulares de colesterol esterificado. Estos resultados sugieren que ambos agentes actúan de forma sinérgica en el macrófago, limitando la formación de células espumosas. Según esto, la mayor reducción en el contenido en ésteres de colesterol de las lesiones que produce la terapia combinada *in vivo*<sup>76,78</sup> sería atribuible a una menor acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos de dichas áreas.

### *Estudios clínicos con avasimibe*

Todavía existen pocos datos acerca de la seguridad y eficacia del avasimibe en clínica. En un estudio de 130 varones y mujeres con hiperlipemia combinada e hipoalfalipoproteinemia<sup>84</sup>, la incidencia de efectos adversos en los pacientes tratados con el fármaco fue similar al grupo placebo, y no se observaron alteraciones significativas en los parámetros de laboratorio analizados (GOT, GPT, CK). El tratamiento con avasimibe produjo reducciones en los valores plasmáticos de triglicéridos (16-23%) y cVLDL (20-30%), por un mecanismo atribuible a la inhibición de la ACAT hepática y a la reducción en la producción de VLDL. Sin embargo, las concentraciones de colesterol total, cLDL y cHDL no resultaron modificadas. A pesar de ello, los estudios en modelos animales indican, como ya se ha comentado, que el avasimibe presenta propiedades antiateroscleróticas directas independientes de sus acciones hipolipemiantes. Con la finalidad de confirmar esta posibilidad en humanos, recientemente se ha presentado el diseño de un es-

tudio clínico<sup>85</sup> en el que se determinará el efecto del avasimibe sobre la progresión de aterosclerosis coronaria mediante técnicas no invasivas (ultrasonidos intravascular [IVUS]). Esta técnica permitirá evaluar el volumen y la composición de las placas de ateroma, pues proporcionará imágenes tridimensionales de la pared y del lumen de las coronarias. Los resultados de este estudio ofrecerán conclusiones más definitivas sobre la eficacia del avasimibe en cuanto a la progresión y la regresión de las lesiones ateroscleróticas en el hombre.

## Conclusiones

La inhibición de la ACAT se perfila como una de las posibilidades terapéuticas más destacables en la búsqueda de nuevos agentes capaces de reducir el riesgo cardiovascular. A pesar de los resultados decepcionantes que se han obtenido en ratones *knockout* para la ACAT1 o a partir de la utilización de agentes que inhiben de forma preferente la ACAT del macrófago, la inhibición parcial, no selectiva, de esta enzima parece ser una opción más prometedora. Los resultados obtenidos con avasimibe, un inhibidor actualmente en desarrollo clínico (fase III), muestran que posee efectos antiateroscleróticos directos adicionales a su acción hipolipemiente, y que la combinación de este agente con estatinas resulta, incluso, más beneficiosa en ambos aspectos. Los estudios clínicos que actualmente se están llevando a cabo con avasimibe determinarán su utilidad real en el tratamiento de la enfermedad aterosclerótica.

## Nota

Durante el proceso editorial de la presente revisión se han publicado los resultados de 2 estudios clínicos realizados con avasimibe. En el primero, se estudió el efecto del avasimibe (750 mg/día) solo o en combinación con atorvastatina (80 mg/día) en pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigota<sup>86</sup>. La combinación con el avasimibe aumentó de forma modesta, aunque significativa, la reducción en las concentraciones plasmáticas de colesterol total que produjo la atorvastatina sola. La segunda publicación corresponde a los resultados del estudio A-PLUS<sup>87</sup>. Según éstos, el volumen total de la placa no se redujo con ninguna de las dosis de avasimibe ensayadas (50, 250 y 750 mg), e incluso se apreció un ligero incremento. Por otra parte, aunque el tratamiento con el avasimibe produjo una reducción de hasta un 16% en los valores plasmáticos de triglicéridos, el cLDL aumentó entre un 8 y un 11%. Parece ser, por tanto, que no se confirman

los efectos beneficiosos del avasimibe sobre el desarrollo de la aterosclerosis coronaria. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que un 88% de los pacientes en este estudio recibió tratamiento concomitante con una estatina, por lo que el incremento en los valores de cLDL podría explicarse por una reducción de la biodisponibilidad de la estatina, debido al efecto inductor del avasimibe sobre el sistema citocromo P4503A4.

## Bibliografía

1. Singh BK, Mehta JL. Management of dyslipidemia in the primary prevention of coronary heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2002; 17:503-11.
2. Expert Panel on Detection Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-97.
3. Maron DJ, Fazio S, McRae FL. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000;101:207-13.
4. Pearson TA, Laurora I, Chu H, Kafonek S. The Lipid Treatment Assessment Project (L-TAP): a multicenter survey to evaluate the percentages of dyslipidemic patients receiving lipid-lowering therapy and achieving low-density lipoprotein cholesterol goals. *Arch Intern Med* 2000;160:459-67.
5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500.
6. Sliskovic DR, White AD. Therapeutic potential of ACAT inhibitors as lipid lowering and anti-atherosclerotic agents. *Trends in Pharmacological Sciences* 1991;12:194-9.
7. Buckert E. New advances in lipid-modifying therapies for reducing cardiovascular risk. *Cardiology* 2002;97:59.
8. Doshi R, Wu J, Fischelevich R, Rodriguez A. Update on the role of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitors in atherosclerosis. *Expert Opin Ther Patents* 2001;11:1655-62.
9. Burnett JR, Wilcox LJ, Huff MW. Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibition and hepatic apolipoprotein B secretion. *Clin Chim Acta* 1999;286:231-42.
10. Olofsson S-O, Asp L, Bören J. The assembly and secretion of Apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1999;10: 341-6.
11. Wilson MD, Rudel LL. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J Lipid Res* 1994;35:943-55.
12. Pape ME, Schultz PA, Rea TJ, DeMattos RB, Kieft K, Bisgaier CL, et al. Tissue specific changes in acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) mRNA levels in rabbits. *J Lipid Res* 1995;36:823-38.
13. Doolittle GM, Chang TY. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in Chinese hamster ovary cells. Enzyme activity determined after reconstitution in phospholipid/cholesterol liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1982;713:529-37.
14. Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. Cholesterol ester formation in cultured human fibroblasts. Stimulation by oxygenated sterols. *J Biol Chem* 1975;250:4025-7.
15. Goldstein JL, Dana SE, Brown MS. Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;4288-92.
16. Chang TY, Doolittle GM. Acyl coenzyme A-cholesterol O-acyltransferase. *Enzymes* 1983;16:523-39.
17. Chang CC, Lee CY, Chang ET, Cruz JC, Levesque MC, Chang TY. Recombinant acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) purified to essential homogeneity utilizes cholesterol in mixed micelles or in vesicles in a highly cooperative manner. *J Biol Chem* 1998;273:35132-41.
18. Chang TY, Chang CCY, Lin S, Yu C, Li B-L, Miyazaki A. Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:289-96.

19. Chang CCY, Huh HY, Cadigan KM, Chang TY. Molecular cloning and functional expression of human acyl-Coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in a mutant chinese hamster ovary cell. *J Biol Chem* 1993;268:20747-55.
20. Meiner VL, Cases S, Myers HM, Sande ER, Bellosta S, Schambelan M, et al. Disruption of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase gene in mice: evidence suggesting multiple cholesterol esterification enzymes in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14041-6.
21. Anderson RA, Joyce C, Davis M, Reagan JW, Clark M, Shelness GS, et al. Identification of a form of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates. *J Biol Chem* 1998;273:26747-54.
22. Cases S, Novak S, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, et al. ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *J Biol Chem* 1998;273:26755-64.
23. Oelkers P, Behari A, Cromley D, Billheimer JT, Sturley SL. Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-related enzymes. *J Biol Chem* 1998;273:26765-71.
24. Chang CC, Chen J, Thomas MA, Cheng D, Del Priore VA, Newton RS, et al. Regulation and immunolocalization of acyl-Coenzyme A:cholesterol acyltransferase in mammalian cells as studied with specific antibodies. *J Biol Chem* 1995;270:29532-40.
25. Lin S, Cheng D, Liu MS, Chen J, Cang TY. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 in the endoplasmic reticulum contains seven transmembrane domains. *J Biol Chem* 1999;274:23276-85.
26. Joyce CW, Shelness GS, Davis MA, Lee RG, Skinner K, Anderson RA, et al. ACAT1 and ACAT2 membrane topology segregates a serine residue essential for activity to opposite sides of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 2000;11:3675-87.
27. Buhman KF, Accad M, Farese RV Jr. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:142-54.
28. 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.
29. Chang CC, Sakashita N, Ornvold K, Lee O, Chang ET, Dong R, et al. Immunological quantitation and localization of ACAT-1 and ACAT-2 in human liver and small intestine. *J Biol Chem* 2000;275:28083-92.
30. Lee RG, Willingham MC, Davis MA, Skinner KA, Rudel LL. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. *J Lipid Res* 2000;41:1991-2001.
31. Matsuda K. ACAT inhibitors as antiatherosclerotic agents: compounds and mechanisms. *Med Res Rev* 1994;14:271-305.
32. Heinonen TM. Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibition: potential atherosclerosis therapy or springboard for other discoveries? *Expert Opin Invest Drugs* 2002;11:1519-27.
33. Yagyu H, Kitamine T, Osuga J, Tozawa R, Chen Z, Kaji Y, et al. Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J Biol Chem* 2000;275:21324-30.
34. Accad M, Smith SJ, Newland DL, Sanan DA, King LE Jr, Fazio S, et al. Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA:cholesterol acyltransferase. *J Clin Invest* 2000;105:711-9.
35. 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.
36. Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, et al. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med* 2000;6:1341-7.
37. 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.
38. Roth BD. ACAT inhibitors: evolution from cholesterol-absorption inhibitors to antiatherosclerotic agents. *Drug Discovery Today* 1998;3:19-25.
39. Natori K, Okazaki Y, Nakajima T, Hirohashi T, Aono S. Mechanism of the inhibition of cholesterol absorption by DL-melinamide: inhibition of cholesterol esterification. *Jpn J Pharmacol* 1986;42:517-23.
40. Rucker W, Prop G, Huther AM. Antiatherosclerotic and antihyperlipidemic effects of octimibate sodium in rabbits. *Atherosclerosis* 1988;69:155-60.
41. Heider JG, Pickens CE, Kelly LA. Role of acyl CoA:cholesterol acyltransferase in cholesterol absorption and its inhibition by 57-118 in the rabbit. *J Lipid Res* 1983;24:1127-34.
42. Ross AC, Go KJ, Heider JG, Rothblat GH. Selective inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase by compound 58-035. *J Biol Chem* 1984;259:815-9.
43. DeVries VG, Schaffer SA, Largis EE, Dutia MD, Wang CH, Bloom JD, et al. Potential antiatherosclerotic agents. 5. An acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase inhibitor with hypocholesterolemic activity. *J Med Chem* 1986;29:1131-3.
44. Harris WS, Dujovne CA, Von Bergmann K, Neal J, Akester J, Windsor SL, et al. Effects of the ACAT inhibitor CL 277,082 on cholesterol metabolism in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1990;48:189-94.
45. Hainer JW, Terry JG, Connell JM, Zyruk H, Jenkins RM, Shand DL, et al. Effect of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor DuP 128 on cholesterol absorption and serum cholesterol in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1994;56:65-74.
46. 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.
47. Verneti LA, MacDonald JR, Wolfgang GH, Dominick MA, Pegg DG. ATP depletion is associated with cytotoxicity of a novel lipid regulator in guinea pig adrenocortical cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;118:30-8.
48. Matsuo M, Hashimoto M, Suzuki J, Iwanami K, Tomoi M, Shimomura K. Difference between normal and WHHL rabbits in susceptibility to the adrenal toxicity of an acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, FR145237. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;140:387-92.
49. 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.
50. 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.
51. Llaверias G, Laguna JC, Alegret M. Pharmacology of the ACAT inhibitor avasimibe (CI-1011). *Cardiovasc Drug Rev* 2003;21:33-50.
52. Llaверias G, Jové M, Vázquez-Carrera M, Sánchez RM, Díaz C, Hernández G, et al. Avasimibe and atorvastatin synergistically reduce cholesteryl ester content in THP-1 macrophages. *Eur J Pharmacol* 2002;451:11-7.
53. Rodríguez A, Usher DC. Anti-atherogenic effects of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, avasimibe (CI-1011), in cultured primary human macrophages. *Atherosclerosis* 2002;161:45-54.
54. 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.
55. 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.
56. Delsing DJ, Offerman EH, Van Duyvenvoorde W, Van Der Boom H, De Wit EC, Gijbels MJ, et al. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe reduces atherosclerosis in addition to its cholesterol-lowering effect in ApoE\*3-Leiden mice. *Circulation* 2001;103:1778-86.
57. Kellner-Weibel G, Jerome WG, Small DM, Warner GJ, Stoltzenberg 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.
58. Azuma Y, Kawasaki T, Ohno K, Seto J, Yamada T, Yamasaki M, et al. Effects of NTE-122, a novel acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, on cholesterol esterification and secretions of apoli-

- poprotein B-containing lipoprotein and bile acids in HepG2. *Jpn J Pharmacol* 1999;79:151-8.
59. Benoist F, Grand-Perret T. ApoB-100 secretion by HepG2 cells is regulated by the rate of triglyceride biosynthesis but not by intracellular lipid pools. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1229-35.
  60. Cianflone KM, Yasruel Z, Rodríguez MA, Vas D, Sniderman AD. Regulation of Apo B secretion from HepG2 cells: evidence for a critical role for cholesteryl ester synthesis in the response to a fatty acid challenge. *J Lipid Res* 1990;31:2045-55.
  61. Musanti R, Giorgini L, Lovisolo PP, Pirillo A, Chiari A, Ghiselli G. Inhibition of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase decreases apolipoprotein B-100 containing lipoprotein secretion from HepG2 cells. *J Lipid Res* 1996;37:1-14.
  62. Ooyen C, Zecca A, Zanelli T, Catapano AL. Decreased intracellular degradation and increased secretion of Apo B-100 in Hep G2 cells after inhibition of cholesteryl ester synthesis. *Atherosclerosis* 1997; 130: 143-52.
  63. Avramoglu RK, Cianflone K, Sniderman AD. Role of the neutral lipid accessible pool in the regulation of secretion of Apo B-100 lipoprotein particles by HepG2 cells. *J Lipid Res* 1995;36:2513-28.
  64. Wilcox LJ, Barret PHR, Newton RS, Huff M. Apo B-100 secretion from HepG2 cells is decreased by the ACAT inhibitor CI-1011. An effect associated with enhanced intracellular degradation of apoB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:939-49.
  65. Burnett JR, Wilcox LJ, Telford DE, Kleinstiver SJ, Barrett PH, Newton RS, et al. Inhibition of ACAT by avasimibe decreases both VLDL and LDL apolipoprotein B production in miniature pigs. *J Lipid Res* 1999;40:1317-27.
  66. Post SM, Zoetewij JP, Bos MH, de Wit EC, Havinga R, Kuipers F, et al. Acyl-Coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor, avasimibe, stimulates bile acid synthesis and cholesterol 7-hydroxylase in cultured rat hepatocytes and *in vivo* in the rat. *Hepatology* 1999; 30:491-50.
  67. Hoang VQ, Botham KM, Benson GM, Eldredge EE, Jackson B, Pearce N, et al. Bile acid synthesis in hamster hepatocytes in primary culture: sources of cholesterol and comparison with other species. *Biochim Biophys Acta* 1993;1210:73-80.
  68. Murakami S, Yamagishi I, Sato M, Tomisawa K, Nara Y, Yamori Y. ACAT inhibitor HL-004 accelerates the regression of hypercholesterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP): stimulation of bile acid production by HL-004. *Atherosclerosis* 1997;133:97-104.
  69. Sampson WJ, Suffolk RA, Bowers P, Houghton JD, Botham KM, Suckling KE. The role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in the metabolism of free cholesterol to cholesteryl esters or bile acids in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1987;920:1-8.
  70. Nicolosi RJ, Wilson TA, Krause BR. The ACAT inhibitor, CI-1011 is effective in the prevention and regression of aortic fatty streak area in hamsters. *Atherosclerosis* 1998;137:77-85.
  71. Ramharack R, Spahr MA, Sekerke CS, Stanfield RL, Bousley RF, Lee HT, et al. CI-1011 lowers lipoprotein(a) and plasma cholesterol concentrations in chow-fed cynomolgus monkeys. *Atherosclerosis* 1998;136:79-87.
  72. Aragane K, Fujinami K, Kojima K, Kusunoki J. ACAT inhibitor F-1394 prevents intimal hyperplasia induced by balloon injury in rabbits. *J Lipid Res* 2001;42:488.
  73. Asami Y, Yamagishi I, Akiyoshi K, Tomoike H, Tsuchida K, Higuchi S. Inhibitory effect of TS-962 on the formation of early atherosclerotic lesions in high fat-fed hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis* 1999;146:237-42.
  74. Azuma Y, Date K, Ohno K, Matsushiro S, Nobuhara Y, Yamada T. NTE-122, an acyl-coA:cholesterol acyltransferase inhibitor, prevents the progression of atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. *Jpn J Pharmacol* 2001;86:120-3.
  75. 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.
  76. 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.
  77. Bocan TM, Krause BR, Rosebury WS, Mueller SB, Lu X, Dagle C, et al. The ACAT inhibitor avasimibe reduces macrophages and matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic lesions of hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:70-9.
  78. Bocan TM, Krause BR, Rosebury WS, Lu X, Dagle C, Bak MS, et al. The combined effect of inhibiting both ACAT and HMG-CoA reductase may directly induce atherosclerotic lesion regression. *Atherosclerosis* 2001;157:97-105.
  79. 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.
  80. Matsuo M, Ito F, Konto A, Aketa M, Tomoi M, Shimomura K. Effect of FR145237, a novel ACAT inhibitor, on atherogenesis in cholesterol-fed and WHHL rabbits. Evidence for a direct effect on the arterial wall. *Biochim Biophys Acta* 1995;1259:254-60.
  81. Nagata Y, Yonemoto M, Iwasawa Y, Shimizu-Nagumo A, Hattori H, Sawazaki Y, et al. N-[2-[N'-pentyl-(6,6-dimethyl-2,4-heptadienyl)amino]ethyl]-(2-methyl-1-naphthylthio)acetamide (FY-087). A new acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor of diet-induced atherosclerosis formation in mice. *Biochem Pharmacol* 1995;49:643-51.
  82. Kurz S, Borthayre AB, Harrison DG. The effect of ACAT inhibition with avasimibe on vascular function in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;(Suppl I):109-10.
  83. 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.
  84. 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.
  85. Tardif JC, Gregoire J, Lesperance J, Lambert J, L'Allier PL, Rodes J, et al. Design features of the avasimibe and progression of coronary lesions assessed by intravascular UltraSound (A-PLUS) clinical trial. *Am Heart J* 2002;144:589-96.
  86. Raal FJ, Marais AD, Klepack E, Lovalvo J, McLain R, Heinonen T. Avasimibe, an ACAT inhibitor, enhances the lipid lowering effect of atorvastatin in subjects with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2003;171:273-9.
  87. Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL, Anderson TJ, Bertrand O, Rodes J, et al. Effects of the acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe on human atherosclerotic lesions. *Circulation* [publicado online] 8 de noviembre de 2004.