

Sobreexpresión génica de citocinas proinflamatorias en macrófagos de sujetos con hipercolesterolemia familiar y xantomas tendinosos

Paula Martín-Fuentes^a, Fernando Civeira^a, María Solanas-Barca^a, Estíbaliz Jarauta^a, Ángel-Luis García-Otín^a, Pilar Calmarza^b y Ana Cenarro^a

^aLaboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

^bServicio de Bioquímica. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

Introducción y objetivo. Entre el 30 y el 50% de los sujetos con diagnóstico genético de hipercolesterolemia familiar (HF) heterocigota presentan xantomas tendinosos (XT), pero el mecanismo por el cual unos sujetos HF desarrollan XT y otros no se desconoce. Previamente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que los macrófagos de sujetos HF con y sin XT desarrollan una respuesta inflamatoria diferente frente a lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox). Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar la expresión génica de diversas moléculas inflamatorias que podrían estar involucradas en la aparición y desarrollo de XT.

Material y métodos. Se seleccionó a 10 pacientes con diagnóstico genético de HF, en los que se midió el diámetro anteroposterior del tendón de Aquiles mediante ecografía de alta resolución. Se aislaron sus monocitos a partir de 40 ml de sangre periférica. Una vez diferenciados a macrófagos, se suplementaron con 50 µg/ml de LDLox durante 1, 3, 6 y 18 h. Mediante RT-PCR en tiempo real, se analizó la expresión de los genes *PPARγ*, *IL-8*, *IL-1β*, *CXCL3*, *triptasa*, *NF-κBIA* y *TNF-α*.

Este trabajo ha sido financiado gracias a los proyectos del Fondo de Investigación Sanitaria (PI03/1106, PI05/0247 y RD06/0014/0029 [RECAVA]) y Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-07042).

Correspondencia: Dra. P. Martín-Fuentes.
Laboratorio de Investigación Molecular.
Hospital Universitario Miguel Servet.
P.º Isabel la Católica, 1-3. 50009 Zaragoza. España.
Correo electrónico: pmartin.iacs@aragon.es

Recibido el 31-8-2007 y aceptado el 29-10-2007.

Resultados y conclusión. Los sujetos HF con XT (HF XT+) mostraron una tendencia a sobreexpresar el gen *IL-8* tras 18 h de incubación con LDLox, mientras que el grupo de sujetos HF sin XT (HF XT-) tendió a sobreexpresar el gen *TNF-α* tras 1 h de incubación con LDLox. El gen *CXCL3* se sobreexpresó significativamente en todos los tiempos de incubación en el grupo HF XT+. Además, se halló una correlación positiva entre la expresión de *CXCL3* y el tamaño del tendón de Aquiles, que fue máxima a 3 h del tratamiento con LDLox ($R = 0,782$; $p = 0,008$). Estos resultados sugieren que *CXCL3* podría desempeñar un papel importante en la etiología de los xantomas, y se puede considerar como un posible marcador predictor de estos depósitos lipídicos.

Palabras clave:
Hipercolesterolemia familiar. Xantomas tendinosos.
Inflamación. Macrófagos. Expresión génica.

PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENE OVEREXPRESSION IN MACROPHAGES OF PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA AND TENDON XANTHOMAS

Introduction and objective. Approximately 30%-50% of patients with genetic diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia (FH) present tendon xanthomas (TX), but the mechanism by which some subjects develop TX and others do not is unknown. Previously, we have shown that macrophages of FH subjects with and without TX develop a different inflammatory response to

oxidized LDL (oxLDL). Therefore, the objective of this work was to analyze the gene expression of several inflammatory molecules that could be involved in the onset and development of TX.

Material and methods. Ten FH patients were selected, and the antero-posterior Achilles tendon diameter was measured with high resolution sonography. Their monocytes were isolated from 40 ml of peripheral blood. When they were differentiated to macrophages, were supplemented with 50 µg/ml of oxLDL for 1, 3, 6 and 18 hours. The gene expression of *PPARγ*, *IL-8*, *IL-1β*, *CXCL3*, *tryptase*, *NF-κBIA* and *TNF-α* was analyzed with real time RT-PCR.

Results and conclusion. The FH subjects with TX (FH TX+) showed a tendency to over-express *IL-8* gene after 18 h of incubation with oxLDL, while FH subjects without TX (FH TX-) tended to over-express *TNF-α* gene after 1 h of incubation. *CXCL3* gene was significantly over-expressed at all incubation times with oxLDL in FH TX+ group. Furthermore, a positive correlation was found between *CXCL3* gene expression and Achilles tendon size, being maximum at 3h of treatment with oxLDL ($R = 0.782$; $p = 0.008$). These results would suggest that *CXCL3* could play an important role in the etiology of xanthomas and could be considered as a possible predictor marker of these lipid deposits.

Key words:

Familial hypercholesterolemia. Tendon xanthomas. Inflammation. Macrophages. Gene expression.

Introducción

La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad monogénica causada por mutaciones en el gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR)¹. Se caracteriza por elevadas concentraciones en plasma del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), depósitos de colesterol en tejido extravascular, como xantomas tendinosos (XT) y arco corneal, y mayor riesgo de enfermedad cardiovascular prematura². En pacientes HF heterocigotos, la expresión clínica de la enfermedad es muy variable en términos de severidad, presencia de XT y edad de aparición de enfermedad cardiovascular, incluso compartiendo la misma mutación en el gen del LDLR^{3,4}.

Los XT son depósitos de lípidos en los tendones que producen engrosamientos y tumoraciones. Están formados por células espumosas cargadas de lí-

pidos, debido a la acumulación de LDL oxidada (LDLox) y tejido conectivo^{5,6}. Son altamente específicos de HF en sujetos con altas concentraciones de cLDL, por lo que es recomendable incluirlos como un importante criterio diagnóstico clínico⁷. Aproximadamente del 30 al 50% de sujetos con diagnóstico genético de HF heterocigota presentan XT^{3,4,8}. El mecanismo por el cual algunos sujetos HF desarrollan XT y otros no, incluso con concentraciones de cLDL similares y compartiendo la misma mutación en el gen *LDLR*, se desconoce³, pero suponen un mayor riesgo cardiovascular⁹. Aunque trabajos anteriores han sugerido que la presencia de XT podría estar controlada por un gen diferente del *LDLR*, éste aún no ha sido identificado¹⁰.

Nuestro grupo ha demostrado previamente que los macrófagos de sujetos HF con y sin XT desarrollan una respuesta inflamatoria diferencial frente a LDLox *in vitro*¹¹. Por ello, la hipótesis de este trabajo fue que la sobreexpresión de ciertas quimiocinas y citocinas proinflamatorias frente a LDLox podría estar involucrada en la aparición y desarrollo de XT. Para evaluar nuestra hipótesis, se analizó el perfil de expresión de los genes *PPARγ*, *NF-κBIA*, *IL-8*, *IL-1β*, *CXCL3*, *tryptasa* (*TPS*) y *TNF-α* en macrófagos de pacientes HF con y sin XT estimulados con LDLox durante diferentes tiempos.

Material y métodos

Sujetos

Se seleccionaron 10 pacientes (6 varones y 4 mujeres) con diagnóstico genético de heterocigosidad para HF causada por mutaciones funcionales en el gen del *LDLR* y, por tanto, diagnóstico seguro de HF de acuerdo con los criterios establecidos en el programa internacional MEDPED. De ellos, 5 (3 varones y 2 mujeres) presentaron XT detectados antes de los 50 años, constituyendo el grupo HF XT+, y 5 (3 varones y 2 mujeres) carecían de XT, constituyendo el grupo HF XT-. El diagnóstico genético se llevó a cabo mediante la identificación de la mutación en el gen *LDLR* con la plataforma Lipochip^{®12}. Ninguno de los pacientes estaba en tratamiento hipolipemiante en el momento de ser reclutado para el estudio. Todos los sujetos participantes firmaron un consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS), de acuerdo con la declaración de Helsinki de 1975, y con la revisión de octubre de 2000.

Perfil lipídico

Se obtuvo una muestra de sangre de cada paciente tras 12 h de ayuno para realizar las medidas de colesterol total en plasma, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y triglicéridos. Las medidas se realizaron con kits de diagnóstico comerciales (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, EE.UU.). El cLDL en plasma se calculó mediante la fórmula de Friedewald.

La lipoproteína(a) se determinó mediante inmunonefelometría con anticuerpos monoclonales (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, EE.UU.).

Determinación del diámetro anteroposterior del tendón de Aquiles

Se determinó el diámetro anteroposterior del tendón de Aquiles (diámetro medio del tendón de Aquiles [DMTA]) mediante ecografía de alta resolución con un ecógrafo Acousting Imaging 5200S (Dornier, Phoenix, EE.UU.) y con una sonda LA 7,5/38 de 7,5 MHz, con el procedimiento descrito previamente por nuestro grupo¹². Para este estudio se consideró la presencia de xantoma cuando el DMTA fue mayor que la media \pm 10 desviaciones estándar (DE) de la población normolípémica española (varones: 10,12 mm; mujeres: 9,61 mm)¹³.

Aislamiento y oxidación de LDL

Se aisló LDL mediante ultracentrifugación secuencial a partir del plasma de un paciente HF homocigoto y se dializó a 4 °C durante 24 h con tampón fosfato salino (PBS). El contenido en proteína de LDL se determinó por el método de Bradford usando albúmina sérica bovina como calibrador. La LDL se diluyó en PBS a una concentración de 200 mg/l para evitar su agregación y se oxidó mediante incubación con 8 μ mol/l de CuCl, durante 24 h a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo 1 mmol/l de EDTA y posterior almacenamiento a 4 °C. La oxidación de LDL se confirmó mediante tinción con negro de Sudán y electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón barbital y también por medida de dienos conjugados mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 234 nm.

Aislamiento y cultivo de monocitos/macrófagos humanos

A cada sujeto seleccionado se le extrajeron 40 ml de sangre periférica sobre heparina de litio (10 U/ml) como anticoagulante. Las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en gradiante de Ficoll-Paque (Amersham Bioscience Corp. Piscataway, NJ, EE.UU.), se lavaron 2 veces con RPMI-1640, sin L-glutamina y suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina) y se resuspendieron en RPMI-1640 completo (con GlutaMAX I y 25 mM de tampón Hepes) suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina), 1% de aminoácidos no esenciales, 2% de piruvato sódico y 1% de suero humano autólogo decomplementado. La decomplementación del plasma se llevó a cabo por incubación en baño húmedo a 56 °C durante 30 min y posterior centrifugación a 3.000 rpm durante 20 min a 18 °C. La viabilidad celular fue > 95% en todos los experimentos, lo que se comprobó mediante tinción con azul trypan. Las células se distribuyeron en 5 frascos de cultivo de 25 cm² a una densidad de $1,8 \times 10^6$ células/ml y se seleccionaron los monocitos mediante adhesión a los frascos durante 2 h a 37 °C y 5% de CO₂. Tras este período de adhesión, se eliminaron las células no adheridas mediante varios lavados con PBS (sin calcio ni magnesio, pH = 7,4). Los monocitos se incubaron durante 24 h con medio de cultivo RPMI-1640 completo con 10% de suero humano autólogo decomplementado. Después de este tiempo, los monocitos se lavaron con PBS y se diferenciaron a macrófagos en un medio libre de suero (Macrophage-Serum Free medium [Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.]), incubando las células a 37 °C durante 9 días en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

Incubación con LDL oxidada

En el día 9 se añadieron 50 μ g/ml de LDLox a 4 de los 5 frascos de cultivo durante 1, 3, 6 y 18 h de incubación a 37 °C. En el frasco restante se añadió PBS en lugar de LDLox, y se utilizó como control.

Aislamiento de ARN total

Después de 10 días se retiró el medio de cultivo, se hicieron varios lavados de los macrófagos con PBS y se procedió a la extracción del ARN total mediante el kit RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm y se comprobó su pureza mediante la razón A260nm/A280nm. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

Síntesis de cADN

Dos μ g de cada muestra de ARN total se trataron con 1 U de DNase I (Ambion Corp., Austin, TX, EE.UU.), en tampón 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ a 37 °C durante 45 min, seguido de la inactivación de la enzima a 65 °C durante 10 min, para eliminar el ADN genómico que pudiera quedar tras la extracción de ARN. Para sintetizar la primera hebra de cADN, se mezclaron 2 μ g del ARN tratado con DNase I con 150 ng de hexámeros al azar (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.) e incubando a 65 °C durante 5 min para desnaturalizar las estructuras secundarias del ARN. Posteriormente, se añadió una mezcla de 0,5 mM de cada dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH = 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 40 U RNase OUT y 200 U SuperScript III-RNase H⁻ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.). La reacción, en un volumen final de 20 μ l, se mantuvo 10 min a 25 °C para facilitar la hibridación de los hexámeros al ARN y posteriormente se incubó durante 1 h a 50 °C, finalizando la reacción con la inactivación de la enzima a 70 °C durante 15 min.

RT-PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix (dNTPs, tampón de reacción y AmpliTaq Gold DNA polimerasa) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), cebadores sin marcar y sondas TaqMan-MGB marcadas con el fluoróforo FAM: Assay on Demand para *IL-1 β* , Hs00174097_m1; *CXCL3*, Hs00171061_m1; *PPAR γ* , Hs00234592_m1; *IL-8*, Hs00174103_m1; *TNF- α* , Hs00174128_m1; *NF- κ B α* , Hs00153283_m1; *18srRNA*, Hs099999901_s1; *RPLP0*, Hs99999902_m1 y *HPRT1*, Hs99999909_m1; y Assay by Design para *triptasa α 2*, basado en la secuencia AF206665 (posición 320-653 pb), en un aparato ABI Prism 7000 HT Sequence Detection System.

El análisis de los resultados se realizó con el Sequence Detector Software (SDS) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Cada reacción se llevó a cabo por triplicado. El cambio de expresión génica se calculó por cuantificación relativa utilizando el método Δ Ct. La expresión se normalizó con los genes constitutivos *18srRNA*, *RPLP0* y *HPRT1* usando el método geNorm^{14,15}.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm DE y como mediana (rango intercuartil). Se comprobó que las variables cuantitativas seguían una distribución normal mediante el test Shapiro-Wilks. El análisis de los datos lipídicos entre los grupos estudiados se realizó mediante el test ANOVA de un factor, y el análisis de la expresión génica mediante el test de la t de Student o el test de la U de Mann-Whitney, según correspondiese. La correlación entre el tamaño del tendón de Aquiles y la expresión génica se llevó a cabo mediante el test de Spearman. El análisis estadístico se realizó con el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc.) versión 11.0, y se consideró significación estadística para todos los análisis un valor de p \leq 0,05.

Resultados

Descripción de los sujetos

Los datos lipídicos y antropométricos de los sujetos incluidos en este estudio se muestran en la tabla 1. Los pacientes HF XT+ presentaron un DMTA de $13,3 \pm 3,74$ mm (media \pm DE) y los pacientes HF XT- un DMTA de $5,66 \pm 0,97$ mm ($p = 0,002$). No se encontró ninguna diferencia estadística entre el grupo de sujetos HF XT+ y el grupo HF XT- con respecto al sexo, colesterol total, cLDL, cHDL, triglicéridos o lipoproteína(a).

Perfil de expresión génica frente a LDL oxidadas

Mediante la técnica de PCR en tiempo real se analizó la expresión génica de diferentes moléculas inflamatorias en los macrófagos de los sujetos seleccionados incubados con LDLox durante diferentes tiempos de incubación: 1, 3, 6 y 18 h. Los genes analizados fueron: el receptor nuclear PPAR γ , el inhibidor del factor de transcripción NF- κ B (NF- κ BIA), las quimiocinas IL-8 y CXCL3, las citocinas IL-1 β y TNF- α y la proteasa triptasa (TPS). Los genes analizados mostraron diferente patrón de expresión en función de las horas de incubación con LDLox, como se muestra en la figura 1. Los genes IL-1 β , CXCL3, TPS y TNF- α alcanzaron su máxima expresión a tiempos cortos de incubación con LDLox (1 o 3 h), IL-8 es el único gen de expresión tardía, alcanzando su máxima expresión a 18 h de incubación con LDLox. No se encontró cambio de expresión en los genes PPAR γ y NF- κ BIA, manteniendo su expresión constante a lo largo del tratamiento con LDLox.

Expresión génica de los grupos HF XT+ y HF XT-

Para evaluar si había diferencias en la expresión de los genes analizados entre los sujetos HF con

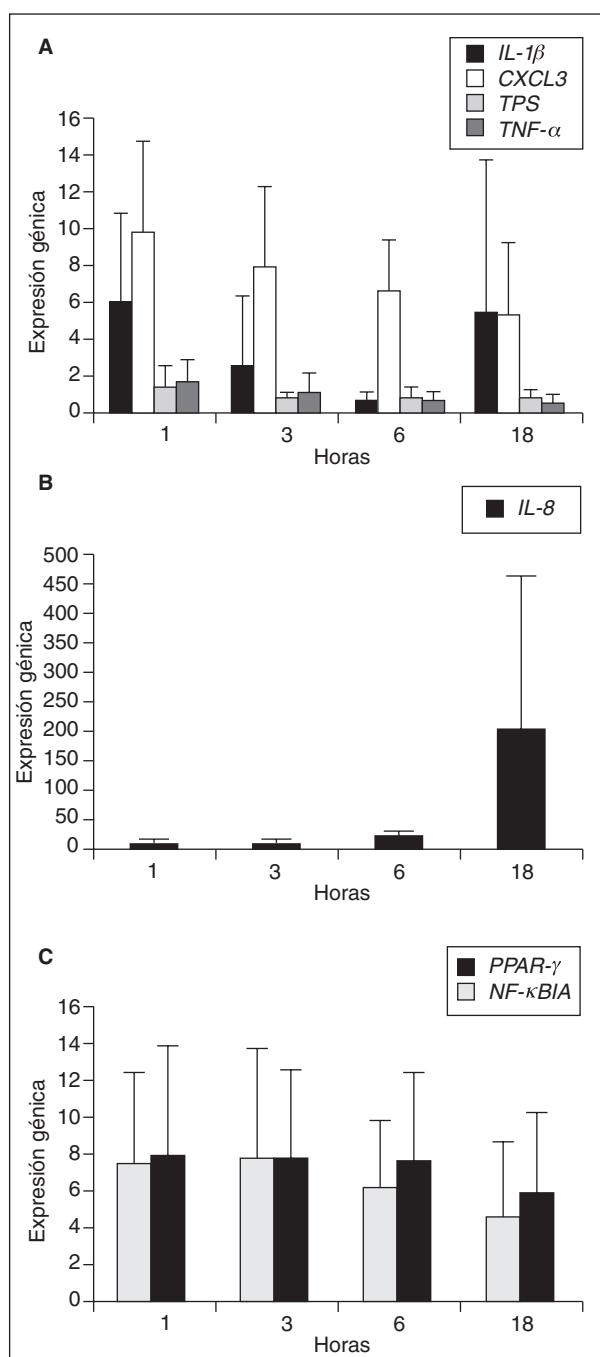
XT y los sujetos HF sin XT, se comparó dicha expresión génica entre ambos grupos de sujetos (tabla 2). Se encontró que el grupo de sujetos HF XT+ expresó más IL-8 tras 18 h de incubación con LDLox que el grupo de sujetos HF XT-, aunque las diferencias no fueron significativas (87,8 [25,9-687] frente a 78,5 [9,14-212]). Sin embargo, se encontró que el gen TNF- α estaba menos expresado en el grupo HF XT+ tras 1 h de incubación con LDLox (rango intercuartil: 0,31-1,05) que en el grupo HF XT- (rango intercuartil: 0,42-4,16), aunque estas diferencias tampoco alcanzaron significación estadística. No se encontraron diferencias en la expresión de los genes PPAR γ , TPS y NF- κ BIA entre los 2 grupos estudiados.

La expresión génica de CXCL3 fue significativamente mayor en el grupo de sujetos HF XT+ que en el grupo HF XT- en todos los tiempos de incubación con LDLox. La mayor diferencia entre ambos grupos se encontró en el tiempo de 18 h de incubación con LDLox, y la tasa de expresión de CXCL3 fue 4 veces mayor en el grupo HF XT+ que en el grupo HF XT-. Para profundizar en la posible implicación de CXCL3 en la aparición de xantomas tendinosos en la HF, se analizó la expresión génica de CXCL3 en función del tamaño del tendón de Aquiles. Para ello, se dividieron los sujetos HF estudiados en terciles según el DMTA, y se analizó la expresión génica de CXCL3 en cada tercil y en cada tiempo de incubación con LDLox (fig. 2). El DMTA en el primer tercil fue de $5,13 \pm 0,55$ mm, en el segundo tercil de $8,69 \pm 2,67$ mm y en el tercer tercil de $14,8 \pm 4,34$ mm. La menor expresión de CXCL3 a cualquier tiempo de incubación con LDLox tuvo lugar en el primer tercil de DMTA (1 h: $6,16 \pm 1,07$; 3 h: $2,79 \pm 2,55$; 6 h: $3,66 \pm 2,01$; 18 h: $2,61 \pm 1,80$), aumentando progresivamente en el segundo tercil

Tabla 1. Datos lipídicos y antropométricos de los sujetos con hipercolesterolemia familiar del estudio, en función de la presencia o ausencia de xantomas tendinosos

	HF XT-	HF XT+	p
n	5	5	
Edad (años)	$44,4 \pm 10,1$	$49,8 \pm 4,43$	NS
Varón/mujer	3/2	3/2	NS
DMTA (mm)	$5,66 \pm 0,97$	$13,3 \pm 3,74$	0,002
IMC (kg/m^2)	$27,4 \pm 4,74$	$27,0 \pm 4,03$	NS
Colesterol total (mg/dl)	$393 \pm 15,5$	$448 \pm 88,6$	NS
cLDL (mg/dl)	$310 \pm 25,9$	$367 \pm 85,9$	NS
cHDL (mg/dl)	$52,3 \pm 17,5$	$57,2 \pm 17,3$	NS
Triglicéridos (mg/dl)	$115 (87,0-179)$	$93,0 (69,5-196)$	NS
Lipoproteína(a) (mg/dl)	$66,3 \pm 37,8$	$55,8 \pm 46,8$	NS

cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; DMTA: diámetro medio del tendón de Aquiles; HF: hipercolesterolemia familiar; IMC: índice de masa corporal; NS: no significativo; XT+: presencia de xantomas tendinosos; XT-: ausencia de xantomas tendinosos.



(1 h: $5,97 \pm 5,20$; 3 h: $3,02 \pm 7,30$; 6 h: $7,26 \pm 3,11$; 18 h: $3,25 \pm 2,39$) y alcanzando su máxima expresión en el tercer tercil (1 h: $11,26 \pm 4,83$; 3 h: $11,34 \pm 7,81$; 6 h: $8,96 \pm 5,25$; 18 h: $10,41 \pm 7,65$). Se ana-

Tabla 2. Datos de expresión génica de macrófagos de sujetos con hipercolesterolemia familiar estimulados con lipoproteínas de baja densidad oxidadas a diferentes tiempos de incubación, en función de la presencia o ausencia de xantomas tendinosos

	HF XT-	HF XT+	p
n	5	5	
<i>PPARγ</i>			
1 h	0,69 (0,29-1,27)	0,70 (0,48-1,04)	NS
3 h	0,57 (0,31-1,10)	0,80 (0,45-1,35)	NS
6 h	0,70 (0,30-1,00)	0,44 (0,29-0,93)	NS
18 h	0,39 (0,14-1,08)	0,12 (0,09-0,72)	NS
<i>IL-8</i>			
1 h	4,53 (2,58-10,2)	7,88 (4,40-11,2)	NS
3 h	5,95 (1,02-9,32)	7,06 (2,99-14,7)	NS
6 h	5,20 (1,24-19,4)	8,18 (3,40-11,4)	NS
18 h	78,5 (9,14-212)	87,8 (25,9-687)	NS
<i>IL-1β</i>			
1 h	3,72 (1,65-11,2)	4,93 (3,22-9,56)	NS
3 h	0,87 (0,49-7,17)	0,85 (0,52-3,37)	NS
6 h	0,29 (0,15-1,10)	0,21 (0,14-0,93)	NS
18 h	2,26 (0,61-15,0)	1,59 (0,75-8,92)	NS
<i>CXCL3</i>			
1 h	5,49 (3,02-6,49)	12,6 (8,89-9,56)	0,016
3 h	2,61 (1,33-5,50)	8,93 (6,83-19,8)	0,008
6 h	4,25 (2,62-5,50)	8,41 (6,01-12,9)	0,024
18 h	1,64 (1,33-3,58)	6,70 (2,95-13,9)	0,032
<i>Triptasa</i>			
1 h	0,76 (0,42-3,07)	0,80 (0,44-1,67)	NS
3 h	0,64 (0,44-0,85)	0,51 (0,25-0,99)	NS
6 h	0,37 (0,28-1,24)	0,48 (0,17-1,24)	NS
18 h	0,62 (0,35-0,68)	0,47 (0,27-1,34)	NS
<i>NF-κBIA</i>			
1 h	0,62 (0,12-1,07)	0,85 (0,47-1,57)	NS
3 h	0,53 (0,22-0,85)	1,20 (0,39-1,55)	NS
6 h	0,71 (0,37-1,04)	0,58 (0,34-1,38)	NS
18 h	0,27 (0,22-0,82)	0,68 (0,27-1,19)	NS
<i>TNF-α</i>			
1 h	1,33 (0,42-4,16)	1,05 (0,31-1,05)	NS
3 h	0,30 (0,19-2,81)	0,21 (0,11-1,39)	NS
6 h	0,09 (0,07-0,81)	0,42 (0,17-1,22)	NS
18 h	0,09 (0,05-1,16)	0,16 (0,09-0,57)	NS

HF: hipercolesterolemia familiar; NS: no significativo; XT+: presencia de xantomas tendinosos; XT-: ausencia de xantomas tendinosos.

Datos expresados como mediana (rango intercuartílico).

lizó la correlación entre la expresión génica de *CXCL3* y el DMTA, encontrándose para cada tiempo de incubación con LDLox los siguientes coeficientes de correlación: 1 h: $R = 0,467$, $p = 0,174$; 3 h: $R = 0,782$, $p = 0,008$; 6 h: $R = 0,612$, $p = 0,060$; 18 h: $R = 0,552$, $p = 0,098$.

Discusión

La HF es una enfermedad monogénica causada por defectos en el gen del *LDLR*, cuya expresión clínica es altamente variable en términos de severidad, presencia de XT y aparición de enfermedad

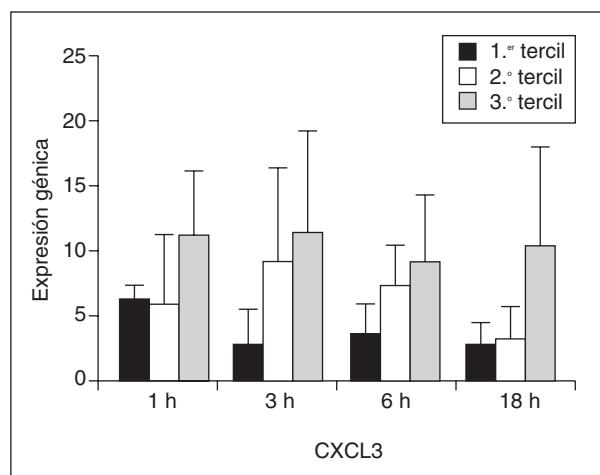


Figura 2. Expresión génica de CXCL3 en función del tamaño del tendón de Aquiles.

Los datos muestran las medias de expresión génica de CXCL3 \pm DE a 1, 3, 6 y 18 h de incubación con lipoproteínas de baja densidad oxidadas en función del tamaño del tendón de Aquiles dividido en terciles.

cardiovascular². El mecanismo por el cual unos sujetos desarrollan XT y otros no, incluso compartiendo las mismas concentraciones de cLDL y la misma mutación en el gen del LDLR, es desconocido³. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que los macrófagos de sujetos HF con XT tienen una respuesta inflamatoria diferente de la de los macrófagos de sujetos HF sin XT. Por ello, en el presente trabajo nos propusimos investigar la expresión génica de ciertas moléculas inflamatorias en relación con la aparición de los XT en la HF.

Nuestros resultados han demostrado que los macrófagos de sujetos HF con XT sobreexpresan el gen CXCL3 de manera significativa, así como el gen IL-8, aunque sin alcanzar significación estadística. CXCL3 es una quimiocina perteneciente a la familia GRO (growth-regulated oncogen), a la que pertenecen también otras 2 proteínas: CXCL1 y CXCL2. Estas proteínas actúan como mediadores en la inflamación, alergia e inmunidad¹⁶ y promueven la adhesión de los monocitos al endotelio vascular a través de la molécula VCAM-1¹⁷. Trabajos previos han demostrado que la estimulación de monocitos humanos con LDLox aumenta la expresión de estas quimiocinas^{18,19}. CXCL3 desencadena estas respuestas mediante unión al receptor CXCR2^{16,20}, proteína que se expresa en condiciones normales en monocitos circulantes y linfocitos T^{21,22}, promueve quimiotaxis de monocitos, acumulación de macrófagos en la íntima, aumento de la adhesión de monocitos a células endoteliales^{23,24} y está implicada en la ateros-

clerosis avanzada²⁵. Además, CXCR2 une otras quimiocinas del tipo C-X-C, como es el caso de IL-8²⁶. IL-8 comparte un 30-40% de homología con las 3 proteínas GRO¹⁶, es quimioatrayente para células T y células musculares lisas presentes en la placa de ateroma y fomenta la adhesión de monocitos a células endoteliales²⁷. Además, se ha demostrado que el contenido intracelular de colesterol aumenta la expresión del gen IL-8 en macrófagos presentes en placas ateroscleróticas humanas^{28,29}.

El hecho de que los macrófagos de sujetos HF con XT sobreexpresen los genes IL-8 y CXCL3 y, sobre todo, el hallazgo de que hay una fuerte correlación entre la expresión génica de CXCL3 y el DMTA, estaría de acuerdo con el papel de esta quimiocina en el reclutamiento, acumulación y adhesión de monocitos y macrófagos en el tendón para dar lugar a los xantomas y, por extensión, en la placa de ateroma. Por ello, IL-8 y, sobre todo, CXCL3, podrían tener un papel importante en la etiología de los xantomas mediante la activación de su receptor común CXCR2.

Nuestros resultados también mostraron que los macrófagos de sujetos HF sin XT tienden a sobreexpresar el gen TNF- α . La citocina TNF- α se encuentra presente en placas ateroscleróticas humanas y de ratón^{30,31}, se produce por diversos tipos celulares como macrófagos, monocitos o linfocitos T y es importante en la inmunidad innata y adaptativa, proliferación celular y procesos apoptóticos³². No se conoce con exactitud el papel de TNF- α en la aterosclerosis, algunos estudios le otorgan un papel proaterogénico³³ y otros antiaterogénico³⁴⁻³⁷. Parece que el tipo de respuesta desencadenada por TNF- α depende del tipo celular y de la activación de receptores específicos; así, las células endoteliales desarrollarían una respuesta proaterogénica, mientras que el resultado en macrófagos y células musculares lisas sería antiaterogénico³⁸. Estos últimos estudios apoyarían nuestros resultados, ya que la única citocina con mayor expresión en macrófagos de sujetos HF sin XT que en los de sujetos HF con XT fue TNF- α , lo que supondría para esta molécula un posible efecto protector frente al desarrollo de estos depósitos lipídicos. El mecanismo por el cual TNF- α ejerce su protección podría ser el propuesto por Gerbod-Giannone et al³⁸, quienes demostraron que TNF- α induce la expresión del transportador ABCA1 a través de la ruta de NF- κ B en macrófagos, aumentando el aclaramiento de colesterol hacia la apolipoproteína A-I y, por tanto, impidiendo que éste se deposite en las células espumosas.

En resumen, los macrófagos de sujetos HF con XT estimulados con LDLox presentan una sobreex-

presión génica de las quimiocinas IL-8 y CXCL3, mientras que los macrófagos de sujetos HF sin XT presentan una tendencia a sobreexpresar el gen *TNF-α*. Estos resultados sugieren que las quimiocinas C-X-C podrían desempeñar un papel importante en la etiología de los xantomas, pudiendo ser *CXCL3* un posible marcador de la aparición y desarrollo de estos depósitos lipídicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de los pacientes en este estudio.

Bibliografía

1. Rader D, Cohen J, Hobbs H. Monogenic hypercholesterolemia: New insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest.* 2003; 111:1795-803.
2. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 2863-913.
3. Ferrières J, Lambert J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia patients with the same LDL receptor gene mutation. *Circulation.* 1995;92:290-5.
4. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, et al. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:41-52.
5. Kruth H. Lipid deposition in human tendon xanthoma. *Am J Pathol.* 1985;121:311-5.
6. Tall A, Small D, Lees R. Interaction of collagen with the lipids of tendon xanthomata. *J Clin Invest.* 1978;62:836-46.
7. Civeira F. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2004;173: 55-68.
8. Descamps O, Gilbeau J, Leysen X, van Leuven F, Heller F. Impact of genetic defects on atherosclerosis in patients suspected of familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Invest.* 2001;31:958-65.
9. Civeira F, Castillo S, Alonso R, Merino-Ibarra E, Cenarro A, Artieda M, et al; Spanish Familial Hypercholesterolemia Group. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with cardiovascular risk independently of the low-density lipoprotein receptor gene mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1960-5.
10. Vergopoulos A, Bajari T, Jouma M, Knoblauch H, Aydin A, Bähring S, et al. A xanthomatosis-susceptibility gene may exist in a syrian family with familial hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet.* 1997;5:315-23.
11. Artieda M, Cenarro A, Junquera C, Lasierra P, Martínez-Lorenzo M, Pocoví M, et al. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with a differential inflammatory response of macrophages to oxidized LDL. *FEBS Lett.* 2005;579: 4503-12.
12. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, López M, Tejedor MT, et al. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem.* 2005;51:1137-44.
13. Civeira F, Castillo J, Calvo C, Ferrando J, de Pedro C, Martínez-Rodés P, et al. Achilles tendon size by high resolution sonography in healthy population. Relationship with lipid levels. *Med Clin (Barc).* 1998;111:41-4.
14. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;6: 279-84.
15. Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, de Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:1-12.
16. Geiser T, Dewald B, Ehrengruber M, Clark-Lewis I, Baggolini M. The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J Biol Chem.* 1993;268:15419-24.
17. Smith D, Galkina E, Ley K, Huo Y. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:1976-84.
18. Holm T, Damás J, Holven K, Nordøy I, Brosstad F, Ueland T, et al. CXC-chemokines in coronary artery disease: Possible pathogenic role of interactions between oxidized low-density lipoprotein, platelets and peripheral blood mononuclear cells. *J Thromb Haemost.* 2003;1:257-62.
19. Schwartz D, Andalibi A, Chaverri-Almada L, Berliner J, Kirchgessner T, Fang Z, et al. Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to mm-LDL-stimulated endothelium. *J Clin Invest.* 1994;94:1968-73.
20. Pelus L, Fukuda S. Peripheral blood stem cell mobilization: The CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. *Exp Hematol.* 2006; 34:1010-20.
21. Chunthrapai A, Lee J, Hébert C, Kim K. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J Immunol.* 1994;153:5682-8.
22. Qin S, LaRosa G, Campbell J, Smith-Heath H, Kassam N, Shi X, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: Correlation with transendothelial chemotactic potential. *Eur J Immunol.* 1996;26: 640-7.
23. Boisvert W, Rose D, Johnson K, Fuentes M, Lira S, Curtiss L, et al. Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am J Pathol.* 2006;168: 1385-95.
24. Lei Z, Zhang Z, Jing Q, Qin Y, Pei G, Cao B, et al. OxLDL upregulates CXCR2 expression in monocytes via scavenger receptors and activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Cardiovasc Res.* 2002;53:524-32.
25. Boisvert W, Santiago R, Curtiss L, Terkeltaub R. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 1998;101:353-63.
26. Ahuja SK, Murphy PM. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J Biol Chem.* 1996;128: 13445.
27. Gerszten RE, García-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature.* 1999;398:718-23.
28. Wang N, Tabas I, Winchester R, Ravalli S, Rabbani LE, Tall A. Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J Biol Chem.* 1996;271:8837-42.
29. Liu Y, Hulten LM, Wiklund O. Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:317-23.
30. Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-43.
31. Glass C, Witztum J. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell.* 2001; 104:503-16.
32. Popa C, Netea M, van Riel P, van der Meer J, Stalenhoef A. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007;48:751-62.
33. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, et al. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic res-

- ponses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:5634-9.
34. Schreyer S, Peschon J, LeBoeuf R. Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55. *J Biol Chem.* 1996;271:26174-8.
35. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 1996;97:1715-22.
36. Kantero E, Pasparakis M, Gijbels M, Vergouwe M, Partoune-Hendriks I, Fijneman R, et al. Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 2003;112:1176-85.
37. Idel S, Dansky H, Breslow J. A20, a regulator of NFkappaB, maps to an atherosclerosis locus and differs between parental sensitive C57BL/6J and resistant FVB/N strains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:14235-40.
38. Gerbod-Giannone M, Li Y, Holleboom A, Han S, Hsu L, Tabas I, et al. TNFalpha induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:3112-7.