

ORIGINAL

Ezetimibe inhibe la adhesión y la migración de monocitos a través de la ruta de las proteíncinasas activadas extracelularmente (p44/p42^{ERK1/2})

Paloma Muñoz-Pacheco, Adriana Ortega-Hernández, Arturo Fernández-Cruz y Dulcenombre Gómez-Garre *

Laboratorio de Biología Vascular, Área de Prevención y Rehabilitación Cardiaca, Instituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos-Universidad Complutense, Madrid, España

Recibido el 30 de diciembre de 2010; aceptado el 10 de mayo de 2011

Disponible en Internet el 1 de julio de 2011

PALABRAS CLAVE

Ezetimibe;
Inflamación;
MAP quinasas

Resumen

Introducción: Recientemente nuestro grupo ha demostrado que ezetimibe, un inhibidor específico de la absorción intestinal, es capaz de inhibir la inflamación vascular en un modelo de arteriosclerosis en conejo. Nuestro objetivo ha sido investigar el efecto de ezetimibe sobre la adhesión y la migración de monocitos humanos THP-1, así como la participación de la vía de señalización de las proteíncinasas activadas extracelularmente (p44/p42^{ERK1/2}) sobre el efecto observado.

Material y métodos: La adhesión se valoró como la capacidad de las células THP-1 para unirse a placas de cultivo, y la migración se determinó con el empleo de cámaras de quimiotaxis. La expresión de moléculas de adhesión se cuantificó mediante citometría de flujo, y la activación de p44/p42^{ERK1/2} se estudió mediante Western Blot.

Resultados: La adhesión y la migración de los monocitos THP-1 inducidas con PMA o MCP-1, respectivamente, se inhibió de forma dependiente de la dosis al preincubar las células con ezetimibe. Además, el tratamiento con ezetimibe inhibió la expresión de las integrinas CD11a y CD11b, así como la fosforilación de p44/p42^{ERK1/2} (la forma activa) inducida por MCP-1. Más del 90% de las células (evaluadas mediante azul tripán) eran viables tras 1 ó 2 días de exposición a ezetimibe.

Conclusiones: Nuestros resultados indican que ezetimibe, además de su actividad hipolipemiante, puede inhibir el proceso de adhesión y migración de los monocitos. Parece que el bloqueo de la ruta de señalización de las MAPK p44/p42^{ERK1/2} podría estar implicado en el efecto observado.

© 2010 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mgomezg.hcsc@salud.madrid.org (D. Gómez-Garre).

KEYWORDS
Ezetimibe;
Inflammation;
MAP kinase**Ezetimibe suppresses adhesion and chemotaxis of human monocytes through the p44/p42^{ERK1/2}-dependent pathway****Abstract**

Introduction: Recently, our group has demonstrated that ezetimibe, a specific inhibitor of intestinal absorption, is able to inhibit vascular inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. In this study, we investigated the effect of ezetimibe on the adhesion and migration of human THP-1 monocytes *in vitro*. We also studied the involvement of the MAP kinase signalling pathway, p44/p42^{ERK1/2}, as a potential mechanism responsible for the observed effect.

Material and methods: Adhesion of THP-1 monocytes was measured as the ability of cells to bind to plates. Migration was studied using two-compartment chambers. The expression of adhesion molecules was assessed by flow cytometry. Activation of p44/p42^{ERK1/2} was measured by Western Blot.

Results: Preincubation of THP-1 monocytes with ezetimibe prevented PMA-induced adhesion and MCP-1-induced migration in a dose-dependent manner. Preincubation of THP-1 monocytes with ezetimibe also inhibited the expression of the integrins CD11a and CD11b, as well as phosphorylation of p-p44/p42^{ERK1/2} (the active form) induced by MCP-1. More than 90% of cells (evaluated through trypan blue) were viable 1 or 2 days after exposure to ezetimibe.

Conclusions: Our results indicate that, in addition to its lipid lowering activity, ezetimibe is able to inhibit the process of adhesion and migration of monocytes *in vitro*. Blocking of the p44/p42^{ERK1/2} MAPK signalling pathway seems to play a role in this anti-inflammatory effect.

© 2010 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

Aunque la arteriosclerosis es sin duda un proceso multifactorial, universalmente se acepta el papel del colesterol en la conformación de la placa aterosclerosa, no solo por su presencia esencial en el núcleo lipídico de la misma sino por su relación con la incidencia de accidentes vasculares, principalmente a nivel coronario¹.

Ezetimibe es el primero de una nueva clase de agentes hipolipemiantes que inhiben selectivamente la absorción del colesterol intestinal y biliar de la dieta, así como otros esteroides de origen vegetal relacionados^{2,3}. En la actualidad se dispone de una amplia experiencia clínica que demuestra la eficacia hipolipemiante de ezetimibe tanto en monoterapia como en combinación con cualquier estatina⁴.

Sin embargo, a pesar de su capacidad hipolipemiante, no existen todavía estudios clínicos que valoren directamente el efecto de ezetimibe sobre los eventos cardiovasculares. Por ello, en los últimos años, varios trabajos han evaluado su efecto ateroprotector empleando distintos modelos experimentales. Se ha demostrado que la administración de ezetimibe a ratones deficientes en ApoE reduce el área de la lesión aterosclerótica tanto en aortas como en arterias carótidas⁵. Este efecto ateroprotector de ezetimibe ha sido recientemente corroborado en un estudio de Dietrich et al⁶ que demuestra una reducción significativa en el grosor de la pared de la aorta de los animales tratados con ezetimibe medido por resonancia magnética. En comparación con ratones deficientes en ApoE, el tratamiento con ezetimibe de ratones deficientes en ApoE y en la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) produce un mayor efecto ateroprotector, sugiriendo así que la ruta de eNOS, aunque no imprescindible, es capaz de aumentar el efecto anti-aterosclerótico de ezetimibe⁷. En algunos estudios se ha sugerido que ezetimibe podría tener algún otro efecto

además de la reducción de lípidos. En este sentido, Nakagami et al⁸ han demostrado que ezetimibe mejora la función endotelial en ratones deficientes en ApoE, y que este efecto se asocia con un aumento en la expresión génica de eNOS y una disminución en la de la interleucina 6 (IL-6)⁸. Recientemente, en un modelo de aterosclerosis acelerada en conejo, nuestro grupo ha demostrado que ezetimibe es capaz de reducir el contenido de monocitos/macrófagos de la placa de aterosclerosis a través de la inhibición de la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1 (del inglés *monocyte chemoattractant protein*)⁹. Además, en comparación con los conejos no tratados, los que recibieron ezetimibe presentaron una menor concentración plasmática de proteína C reactiva (PCR), un marcador inflamatorio que se ha asociado con un aumento del riesgo cardiovascular.

En los últimos años se ha puesto en evidencia que los monocitos/macrófagos juegan un papel fundamental tanto en la formación de la placa de arteriosclerosis como en sus complicaciones trombóticas^{10,11}. Una de las primeras etapas en el desarrollo de la placa de aterosclerosis es la unión de los monocitos circulantes al endotelio vascular a través de moléculas de adhesión, con la posterior transmigración hacia la capa subintimal. Este proceso está favorecido por quimiocinas como MCP-1¹².

En este trabajo hemos investigado la eficacia antiinflamatoria de ezetimibe *in vitro*. Para ello, hemos estudiado el efecto de ezetimibe sobre la adhesión y la migración de monocitos humanos y sobre la expresión de diferentes moléculas de adhesión. Puesto que existe amplia evidencia sobre la participación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), principalmente p42/p44^{ERK1/2} y p38, sobre la migración celular inducida por quimiocinas¹³, además hemos investigado la participación de la vía de señalización de las MAPK/p42/p44^{ERK1/2} en el efecto de ezetimibe.

Material y métodos

Cultivo celular

Las células de la línea de monocitos humanos THP-1 se adquirió en la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron en medio RPMI 1640 (BioWhittaker) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) decomplementado, 2 mmol/l de L-Glutamina y 50 U/ml de penicilina y estreptomicina a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Ensayo de adhesión celular

Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 con 0,5% de SBF durante 24 h para hacerlas quiescentes, se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de 25 × 10³ células/pocillo y se estimularon con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 ng/ml durante 20 h a 37 °C. En algunos experimentos las células se preincubaron con diferentes concentraciones de ezetimibe durante 2 h antes de ser estimuladas con PMA. Pasado el tiempo de incubación, se eliminó el medio y se añadió paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) durante 20 min. Las células fijadas se lavaron y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,5%. Tras eliminar el exceso de colorante, se añadió acético glacial y se cuantificó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (TECAN-Sunrise). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo de quimiotaxis celular

El estudio de la respuesta quimiotáctica de las células THP-1 se llevó a cabo usando insertos transwell® de 6,5 mm de diámetro con membrana de policarbonato de 5 μm de poro (Costar). Un total de 3 × 10⁵ células se resuspendieron en medio RPMI 1640 con 0,5% de SBF y se colocaron en el pocillo superior. En algunos experimentos las células se incubaron con distintas concentraciones de ezetimibe durante 2 h a 37 °C una vez colocadas en el pocillo superior. A continuación se añadieron 100 ng/ml de MCP-1 (Preprotech) al pocillo inferior y se permitió que las células migraran durante 1 h a 37 °C. Finalizado este tiempo, se recogió el contenido del pocillo inferior y se cuantificó el número de células usando un citómetro de flujo EPICS XL-MCL (Beckman Coulter), pasando cada muestra en las mismas condiciones de flujo y tiempo. La quimiotaxis específica se expresó en relación con el porcentaje de células THP-1 que migraron en respuesta a MCP-1, que se tomó como 100%. Todos los estudios se midieron por duplicado.

Citometría de flujo

Las células THP-1 resuspendidas en medio RPMI 1640 con 0,5% de SBF se activaron con PMA (100 ng/ml) o MCP-1 (100 ng/ml) durante 24 h a 37 °C. En algunos experimentos se trataron previamente con ezetimibe (10⁻⁵ mol/l) durante 24 h a 37 °C. Pasado el tiempo de activación, las células se centrifugaron y se incubaron con distintos anticuerpos: anti-CD11a (dilución 1/10), anti-CD11b (dilución 1/10) y anti-CD11c (dilución 1/10) (Beckman Coulter) durante 30 min a

temperatura ambiente en oscuridad. A continuación se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (dilución 1/100; Becton Dickinson) durante 30 min. Después de un lavado con PBS, las células se resuspendieron en paraformaldehído al 0,2% en PBS y se pasaron por un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Para comprobar si había uniones inespecíficas, todas las muestras se marcaron con un control de isotypio de IgG1-FITC (Beckman Coulter). En cada experimento se midió la intensidad de fluorescencia media (IFM).

Estudios de Western blot

Las células se lisaron con un tampón comercial (NE-PER kit; Pierce) suplementado con inhibidores de proteasas: PMSF 0,25 mM, aprotinina 2 μl/ml, leupeptina 2 μg/ml, NaF 1 mmol/l y ortovanadato sódico 100 μmol/l. 30 μg de extracto de proteínas totales se separaron electroforéticamente en geles de SDS-poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Immobilon P, Millipore). Las uniones inespecíficas de las membranas se bloquearon con tampón tris-borato-salino (TBS) con albúmina de suero bovina (BSA) 5% y Tween-20 al 0,5% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se incubó con un anticuerpo policlinal que reconoce los residuos fosforilados de p44/42^{ERK1/2} (p-p44/42^{ERK1/2}, dilución 1/1000; Cell Signalling) durante 18 h a 4 °C. A continuación las membranas se lavaron y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1/2.500; Amersham) durante 1 h en agitación. Las bandas de las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL; Amersham). Como control de carga, las membranas se incubaron con un anticuerpo que reconoce la α-tubulina (dilución 1/8.000, Sigma-Aldrich) durante 2 h a temperatura ambiente.

Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de densitometrada (UAD) respecto a la expresión de α-tubulina.

Viabilidad celular

Para evaluar el efecto de ezetimibe sobre la supervivencia celular se incubaron 3 × 10⁵ células/pocillo con diferentes concentraciones de ezetimibe. Pasados uno o dos días, la viabilidad celular se determinó mediante un ensayo de exclusión con azul tripán. Para la coloración se mezclaron 10 μl de suspensión celular y 10 μl de solución de azul triplán al 0,4%. El recuento de las células viables se hizo en un microscopio óptico usando una cámara de Neubauer. La supervivencia celular se expresa como: (número de células vivas tras la incubación con ezetimibe/número de células vivas del grupo control sin ezetimibe) × 100.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media ± error estándar de la media (EEM). Las variables se analizaron mediante los test no paramétricos de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney. Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS

Tabla 1 Efecto de ezetimibe (10^{-5} mol/l) sobre la adhesión de monocitos THP-1 estimulados con citoquinas proinflamatorias

	Sin ezetimibe	Con ezetimibe
Basal	100 ± 9	91 ± 5
IL-1 (100 U/ml)	171 ± 17^a	124 ± 5^b
TNF- α (100 ng/ml)	153 ± 23^a	125 ± 14^b
MCP-1 (100 ng/ml)	183 ± 24^a	143 ± 11^b

Los resultados se expresan como media \pm EEM, n = 3 experimentos por triplicado.

^a p < 0,05 respecto al basal.

^b p < 0,05 respecto al mismo estímulo sin ezetimibe.

para Windows versión 15.0. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando p < 0,05.

Resultados

Efecto de ezetimibe sobre la viabilidad celular

Antes de proceder a los ensayos de adhesión y quimiotaxis, realizamos estudios de citotoxicidad de ezetimibe. Los monocitos humanos THP-1 se incubaron con las concentraciones más altas de ezetimibe (10^{-6} - 10^{-4} mol/l) a distintos tiempos (24 y 48 h). Tras 48 h de exposición a ezetimibe, más del 90% de los monocitos eran viables a cualquiera de las dosis estudiadas (10^{-6} mol/l: 94 ± 8 ; 10^{-5} mol/l: 96 ± 6 ; 10^{-4} mol/l: 93 ± 3 células vivas).

Ezetimibe disminuye la adhesión de monocitos humanos

Las células THP-1 derivan de una línea celular monocítica que crece en suspensión y que no se adhiere a las superficies de plástico de las placas de cultivo¹⁴. Sin embargo, tras la activación con PMA estas células se diferencian y adquieren características morfológicas de macrófagos, siendo capaces de adherirse a plástico. Este efecto aumenta a medida que crece la dosis de PMA a la que son expuestas las células (basal: 100 ± 3 , PMA 0,1 ng/ml: 109 ± 3 , PMA 1 ng/ml: 206 ± 8 , PMA 10 ng/ml: 296 ± 19 , PMA 100 ng/ml: $410 \pm 17\%$ células adheridas, p < 0,05).

Para estudiar si ezetimibe era capaz de interferir este proceso, en los experimentos siguientes los monocitos se preincubaron con diferentes concentraciones de ezetimibe (10^{-10} - 10^{-4} mol/l) durante 2 h y posteriormente se estimularon con PMA 100 ng/ml. El tratamiento de los monocitos con dosis de ezetimibe de 10^{-10} y 10^{-9} mol/l no tuvo ningún efecto sobre la adhesión celular inducida por PMA (datos no mostrados), siendo necesarias dosis de 10^{-7} mol/l y superiores para observar una disminución en la cantidad de células adheridas tras la estimulación con PMA (fig. 1A). La adhesión de los monocitos se redujo más de un 60% con ezetimibe a dosis de 10^{-5} mol/l y más de un 90% con la dosis de 10^{-4} mol/l respecto a las células estimuladas solo con PMA.

Ezetimibe también fue capaz de inhibir la adhesión de los monocitos inducida por proteínas proinflamatorias como IL-1, TNF- α y MCP-1 (tabla 1).

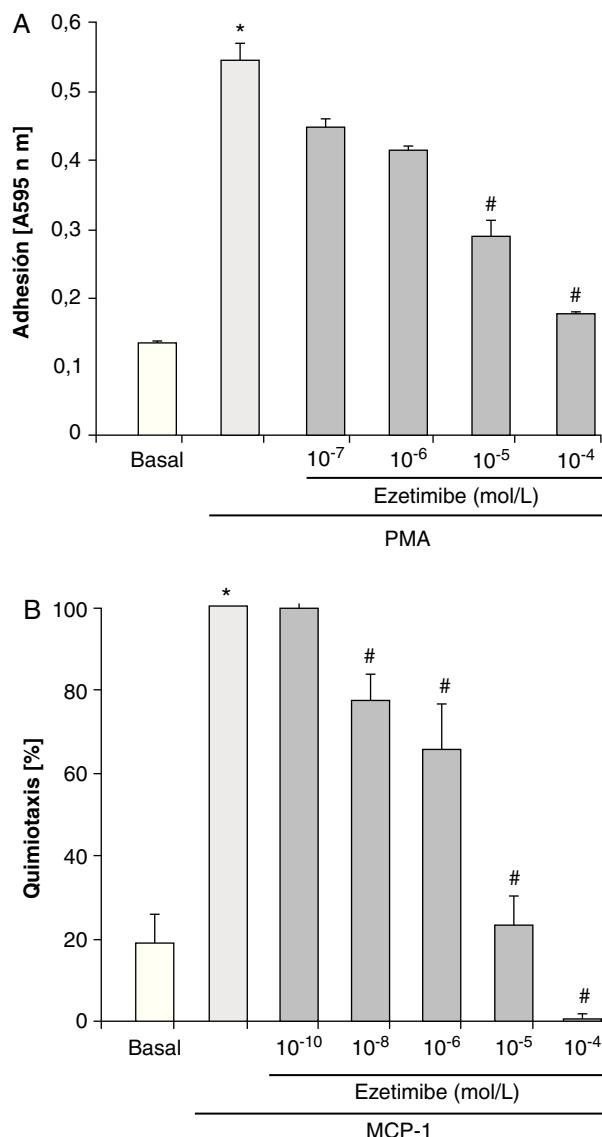


Figura 1 Efecto de distintas concentraciones de ezetimibe sobre la adhesión (A) y la migración (B) de monocitos/macrófagos humanos THP-1 estimulados con PMA (100 ng/ml) o MCP-1 (100 ng/ml), respectivamente. Los datos son la media \pm EEM, n = 5 experimentos por triplicado o duplicado. *p < 0,05 vs basal, #p < 0,05 vs PMA o MCP-1 solo.

Ezetimibe inhibe la quimiotaxis de monocitos humanos

Para evaluar el efecto de ezetimibe sobre la quimiotaxis de los monocitos THP-1 utilizamos MCP-1 (100 ng/ml) como inductor. En la figura 1B se muestra que ezetimibe fue capaz de inhibir la quimiotaxis de estas células de forma dependiente de la dosis, alcanzando casi el 100% de inhibición a una concentración de 10^{-5} mol/l. Un dato un tanto sorprendente fue que la incubación de las células con ezetimibe 10^{-4} mol/l inhibió la migración de las células por debajo de los valores basales.

Ezetimibe disminuye la expresión de moléculas de adhesión

Dada la importancia de las moléculas de adhesión en el proceso de adhesión de los monocitos al endotelio y su posterior migración, se ha postulado que la inhibición de su expresión podría ser una opción terapéutica antiaterogénica. Por ello, una vez investigados los efectos de ezetimibe sobre la adhesión celular y la quimiotaxis, nos planteamos estudiar si el efecto de ezetimibe podía deberse a su interferencia con la expresión de las integrinas CD11a, CD11b y CD11c. Estas moléculas de adhesión han sido implicadas en el proceso aterosclerótico y se expresan solamente en los leucocitos¹². La estimulación de las células con PMA (100 ng/ml) y MCP-1 (100 ng/ml) indujo un aumento en la expresión de CD11a y CD11b analizada por citometría de flujo, aunque el efecto de MCP-1 sobre la expresión de CD11b no alcanzó significación estadística (fig. 2). Ninguno de los dos estímulos fue capaz de alterar la expresión de CD11c (datos no mostrados). Como se muestra en la figura 2, la preincubación de los monocitos con ezetimibe inhibió el efecto de PMA y de MCP-1 sobre la expresión de ambas integrinas, llegando incluso a valores basales.

Efecto de ezetimibe sobre la activación de MAPK/p44/p42^{ERK1/2}

Puesto que es bien conocida la implicación de la ruta de señalización de las MAPKs, principalmente las cinasas reguladas por señales extracelulares p44/p42^{ERK1/2}, en el proceso de adhesión y migración celular¹⁵, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el efecto de ezetimibe sobre su activación. Para ello utilizamos un anticuerpo específico que reconoce los residuos fosforilados de treonina y serina de p44/p42^{ERK1/2}, responsables de la actividad de esta proteína. Como se había descrito previamente, la estimulación de monocitos con MCP-1 da lugar a la activación de p44/p42^{ERK1/2}. El pretratamiento de las células con ezetimibe durante 24 h redujo la activación de p44/p42^{ERK1/2} inducida por MCP-1 a todos los tiempos estudiados (fig. 3).

Discusión

Los monocitos/macrófagos desempeñan un papel fundamental en todas las etapas de la aterosclerosis, por lo que constituyen una importante diana terapéutica anti-aterosclerótica. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que ezetimibe es capaz de reducir el contenido de monocitos/macrófagos de la placa de aterosclerosis a través de la inhibición de la expresión de MCP-1⁹. En este trabajo hemos demostrado que ezetimibe es capaz de interferir el proceso de adhesión de los monocitos diferenciados con PMA o estimulados por citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α o MCP-1 y la quimiotaxis inducida por MCP-1 in vitro a través de la inhibición de la expresión de las integrinas leucocitarias CD11a y CD11b. Además, este efecto antiinflamatorio de ezetimibe podría estar mediado, al menos en parte, por la inhibición de la ruta de señalización de las MAPK/p44/p42^{ERK1/2}.

En la actualidad la arteriosclerosis se considera una enfermedad inmunológico-inflamatoria sistémica de la

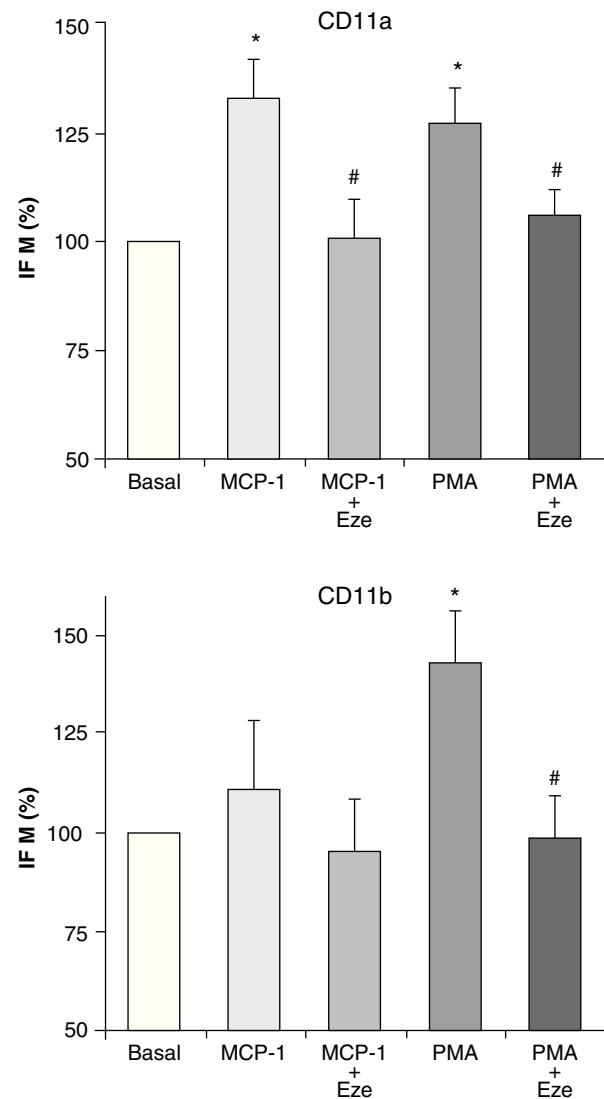


Figura 2 Efecto de ezetimibe (10^{-5} mol/l) sobre la expresión de CD11a y CD11b en monocitos/macrófagos humanos THP-1 estimulados con PMA (100 ng/ml) o MCP-1 (100 ng/ml). Los datos son la media ± EEM, n = 3. *p < 0,05 vs basal, #p < 0,05 vs PMA o MCP-1 solo.

sangre y de los vasos. Los macrófagos, las células endoteliales y las células musculares lisas producen citoquinas inflamatorias como TNF- α , interferón gamma (IFN- γ), IL-1 e IL-6. Diversos estudios han demostrado que niveles plasmáticos elevados de estas citoquinas predicen la existencia de futuros episodios cardiovasculares, incluso en sujetos aparentemente sanos¹⁶. Estas citoquinas rompen el equilibrio fisiológico que mantienen las células endoteliales en relación con la producción de óxido nítrico y el número de moléculas de adhesión, generando disfunción celular. Tanto en modelos animales de aterosclerosis como en lesiones ateroscleróticas humanas, las moléculas de adhesión se encuentran sobreexpresadas en relación con el tejido vascular normal¹⁷. Además, se ha demostrado que los ratones deficientes en selectina-E, selectina-P o ICAM-1 desarrollan menos arteriosclerosis que los ratones normales. También en humanos, tanto en sujetos sanos como en

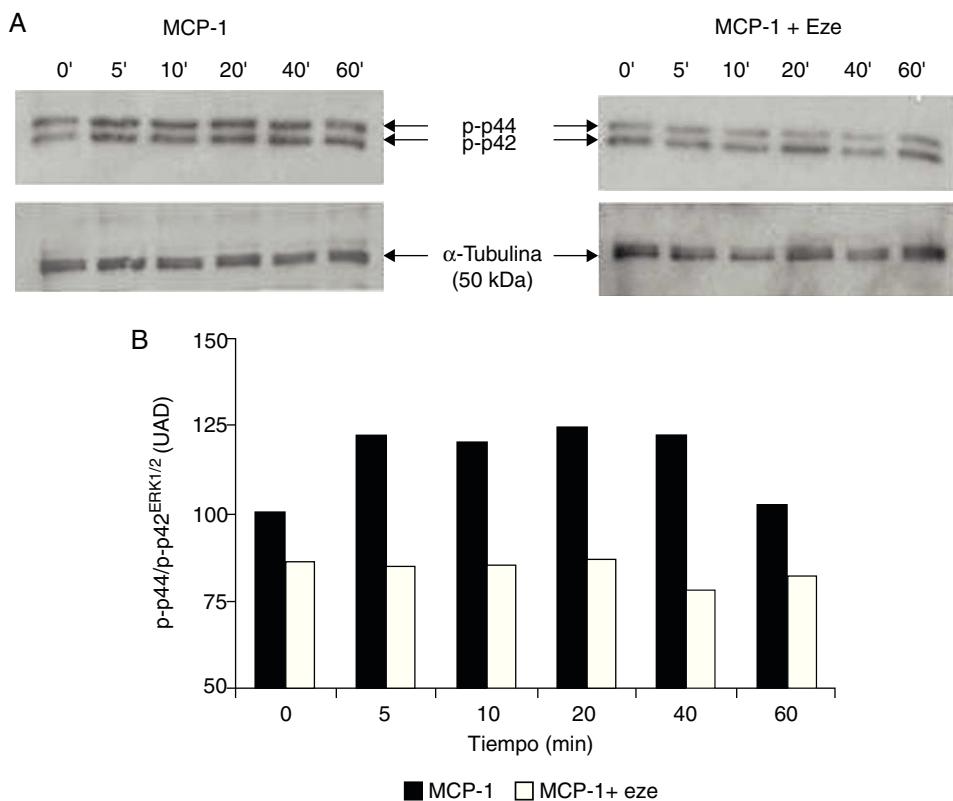


Figura 3 Efecto de ezetimibe sobre la activación de p44/p42^{ERK1/2} en monocitos humanos THP-1 evaluada por Western blot. (A). Las autorradiografías muestran un experimento representativo. Las células se incubaron en ausencia o presencia de ezetimibe (10^{-5} mol/l) y se estimularon con MCP-1 (100 ng/ml) a diferentes tiempos. Los lisados de las células se revelaron con un anticuerpo que reconoce los residuos de serina y treonina fosforilados (p-p44/p42^{ERK1/2}). (B). Análisis densitométrico de la expresión de la forma fosforilada p44/p42^{ERK1/2}. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de densitometrado (UAD) respecto a la α -tubulina que se utilizó como control de carga.

pacientes con enfermedad coronaria previa, se observó que un aumento en los valores plasmáticos de selectina-E, ICAM-1 o VCAM-1 predecía la posibilidad de presentar un episodio cardiovascular. La interacción entre el endotelio y los monocitos/macrófagos se realiza a través de la unión entre las integrinas de la familia $\beta 2$, principalmente CD11a/CD18 y CD11b/CD18, y las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio ICAM-1 y VCAM-1¹². Una vez que las células están adheridas al endotelio, migran al espacio subendotelial atraídas por citoquinas como MCP-1 o la IL-8¹⁰⁻¹². MCP-1 es el principal factor encargado del reclutamiento de monocitos. Se ha demostrado que ratones deficientes en MCP-1, o en su receptor, poseen un menor número de monocitos infiltrados, a la vez que una disminución en el desarrollo de la lesión ateromatosa^{18,19}. En pacientes con síndrome coronario agudo las concentraciones plasmáticas de MCP-1 se han asociado con diferentes factores de riesgo cardiovascular, así como con un mayor riesgo de padecer un episodio cardiovascular en el futuro²⁰. En nuestro trabajo hemos observado que la preincubación de los monocitos con ezetimibe inhibe la adhesión y la migración celular coincidiendo con la disminución en la expresión de CD11a y CD11b. Algunos estudios han demostrado que la expresión de estas moléculas de adhesión está mediada por la activación del factor de transcripción NF- κ B. En un trabajo previo, nuestro grupo ha demostrado que la administración de ezetimibe

disminuye la actividad NF- κ B en monocitos circulantes⁹. En conjunto, nuestros resultados sugieren un mecanismo por el cual ezetimibe podría interferir con el reclutamiento de las células en los sitios de la lesión.

Un dato importante que hay que destacar de nuestros resultados es que el PMA no es en rigor un inductor de adhesión sino de diferenciación de THP-1 a macrófagos, por lo que en este caso el efecto de ezetimibe sería inhibidor de la diferenciación más que propiamente de la adhesión. Sin embargo, el hecho de que ezetimibe inhibe también la adhesión de citoquinas proinflamatorias que no inducen la diferenciación de los monocitos sugiere que ezetimibe podría interferir tanto en el reclutamiento de monocitos como en su posterior diferenciación, un proceso que ha demostrado ser clave en el desarrollo de la arteriosclerosis¹⁰⁻¹².

Aunque la interacción dinámica entre los leucocitos y las células endoteliales está mayoritariamente regulada por uniones físicas entre moléculas de adhesión^{12,17}, se ha visto que las cascadas de transducción de señales también tienen un importante papel en este mecanismo. Actualmente hay muchas evidencias que apoyan que las MAPKs juegan un papel importante en la regulación no solo de procesos como la proliferación celular, la apoptosis, la migración o la diferenciación, sino también en la expresión de muchos genes proinflamatorios implicados en el desarrollo de la

aterosclerosis¹³. Además, se ha descrito que las diferentes cascadas de las MAPKs están implicadas en la activación de las integrinas y en la quimiotaxis de monocitos THP-1. Por ejemplo, la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos con PMA induce la activación de la cascada de señalización de p44/p42^{ERK1/2}, que activa a su vez el factor de transcripción NF-κB regulando la expresión de ICAM-1 entre otras moléculas^{21,22}. También la migración de los monocitos inducida por MCP-1 depende de la activación de varias MAPK, como p44/p42^{ERK1/2} o p38²³. Nuestros resultados sugieren que ezetimibe podría inhibir la expresión de moléculas de adhesión a través de la inhibición de la activación de p44/p42^{ERK1/2}.

La relación entre hipercolesterolemia e inflamación es bien conocida. La estatinas, los fármacos hipolipemiantes más utilizados, han demostrado su capacidad de inhibir la expresión de proteínas proinflamatorias (por ej., TNF-α, IL-1 e IL-6) y proteínas quimiotácticas (por ej., IL-8, RANTES y MCP-1)^{24,25}. También se las ha involucrado en la inhibición del factor de transcripción NF-κB, relacionado con la expresión de genes proinflamatorios, y en el aumento de la actividad de factores de transcripción que antagonizan la expresión de genes proinflamatorios como el sistema PPAR²⁶⁻²⁸. Algunas estatinas reducen la adhesión celular y la expresión de integrinas^{29,30}. Incluso algunos estudios, como el JUPITER (Justification for the Use of statins in Primary prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin), apoyan la utilidad de la monitorización de los niveles de inflamación como guía terapéutica en la prevención de episodios cardiovasculares³¹.

No hay muchos estudios que evalúen el efecto antiinflamatorio de ezetimibe, aunque los que existen sugieren que este efecto existe, sobre todo cuando se administra con una estatina. En pacientes con hipercolesterolemia, la administración de ezetimibe disminuyó los niveles plasmáticos de PCR con respecto a pacientes no tratados, aunque esta disminución solo alcanzó significación estadística cuando el ezetimibe se administró en combinación con simvastatina³². Por el contrario, en pacientes con artritis reumatoide tratados con ezetimibe en monoterapia sí se observó una reducción significativa de los niveles de PCR de forma similar a como lo hizo simvastatina³². Es interesante destacar que la administración de ezetimibe junto con una estatina se asoció con una mayor reducción de los valores de PCR, aunque no cuando se administró junto a un fibrato³³. Ezetimibe también ha demostrado que puede disminuir los niveles plasmáticos de la lipoproteína asociada a fosfolipasa A2 (Lp-PLA2), otro parámetro inflamatorio implicado en el proceso aterogénico³². En modelos experimentales, todos los trabajos publicados hasta el momento demuestran un efecto antiinflamatorio de ezetimibe⁷⁻⁹.

La ruta de señalización por la cual ezetimibe podría ejercer su efecto antiinflamatorio no se conoce aún. Sin embargo, la aminopeptidasa N (APN) o CD13, recientemente identificada como una molécula diana de ezetimibe³⁴, se ha relacionado con fenómenos de adhesión y migración de los leucocitos³⁵. Se ha demostrado que los monocitos localizados en los sitios de inflamación expresan grandes cantidades de APN/CD13 en sus membranas³⁵. Además, inhibidores de su actividad han demostrado ser potentes compuestos inmunomoduladores, antiinflamatorios y antiproliferativos³⁵. En los monocitos se ha descrito que APN/CD13 induce una

activación rápida de las quinasas de tirosina³⁶. Además, la incubación de monocitos/macrófagos con ezetimibe reduce la expresión superficial de APN/CD13, así como de CD16, CD64 y el receptor «basura» (scavenger) CD36, lo que impide la diferenciación de las células y la absorción de lípidos³⁷, otro de los pasos claves en el proceso inflamatorio.

Una limitación de nuestro estudio es que la dosis de ezetimibe es más de 400 veces mayor que la encontrada en plasma humano. Sin embargo, ni siquiera a dosis tan elevadas se ha observado inhibición de procesos bioquímicos o celulares. Además, en estudios toxicológicos y de carcinogénesis realizados en ratas, ratones y perros con dosis de ezetimibe hasta 1.000 veces mayores que las encontradas en plasma humano no se han descrito lesiones proliferativas ni toxicidad en órganos diana³⁸.

En resumen, en este trabajo hemos demostrado que ezetimibe es capaz de interferir el proceso de la adhesión y la quimiotaxis de monocitos *in vitro* a través de la reducción en la expresión de moléculas de adhesión. Además, este efecto antiinflamatorio de ezetimibe parece estar mediado, al menos en parte, por la inhibición de la ruta de señalización de las MAPK p44/p42^{ERK1/2}. El esclarecimiento de los mecanismos de acción de ezetimibe nos puede ayudar a identificar con más detalle los pacientes que mejor se pueden beneficiar de esta terapia.

Agradecimientos

Queremos agradecer la asistencia técnica en la realización de los estudios de Western Blot del Laboratorio de Fisiopatología osteoarticular de la Fundación Jiménez Díaz. Este trabajo ha sido financiado en parte con ayudas del Fondo de Investigación Sanitaria (07/882, 09/2322, 10/1009) y la Red de Investigación en Insuficiencia Cardiaca (REDINSCOR, 06/0003/0011). DG-G pertenece al Programa de Estabilización de Personal Investigador del Instituto de Salud Carlos III y la Comunidad de Madrid. Una comunicación referente a esta línea de trabajo titulada «Ezetimibe inhibe la adhesión y migración de monocitos humanos inducida por citoquinas proinflamatorias» fue presentada en el XXIII Congreso Nacional de la SE, en Pamplona (2009), y galardonada con una Mención Especial.

Bibliografía

1. Brunzell JD, Hokanson JE. Low-density and high-density lipoprotein subspecies and risk for premature coronary artery disease. *Am J Med*. 1999;107:165–85.
2. Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A, Igel M, Tribble DL, Shah S, et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation*. 2002;106:1943–8.
3. Bruckert E, Giral P, Tellier P. Perspectives in cholesterol-lowering therapy: the role of ezetimibe, a new selective inhibitor of intestinal cholesterol absorption. *Circulation*. 2003;107:3124–8.
4. Dembowski E, Davidson MH. Statin and ezetimibe combination therapy in cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009;16:183–8.
5. Davis Jr HR, Compton DS, Hoos L, Tetzloff G. Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:2032–8.

6. Dietrich T, Hucko T, Bourayou R, Jahnke C, Paetsch I, Atrott K, et al. High resolution magnetic resonance imaging in atherosclerotic mice treated with ezetimibe. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2009;25:827–36.
7. Kuhlencordt PJ, Padmapriya P, Rutzel S, Schodel J, Hu K, Schafer A, et al. Ezetimibe potently reduces vascular inflammation and arteriosclerosis in eNOS-deficient ApoE ko mice. *Atherosclerosis.* 2009;202:48–57.
8. Nakagami H, Osako MK, Takami Y, Hanayama R, Koriyama H, Mori M, et al. Vascular protective effects of ezetimibe in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2009;203:51–8.
9. Gómez-Garre D, Muñoz-Pacheco P, González-Rubio ML, Aragoncillo P, Granados R, Fernández-Cruz A. Ezetimibe reduces plaque inflammation in a rabbit model of atherosclerosis and inhibits monocyte migration in addition to its lipid-lowering effect. *Br J Pharmacol.* 2009;156:1218–27.
10. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135–43.
11. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115–26.
12. Pou J, Rebollo A, Alegret M. El monocito/macrófago como diana terapéutica en la aterosclerosis. *Clin Invest Arterioscl.* 2007;19:92–108.
13. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78:539–52.
14. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980;26:171–6.
15. Wain JH, Kirby JA, Ali S. Leucocyte chemotaxis: Examination of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase activation by Monocyte Chemoattractant Proteins-1, -2, -3 and -4. *Clin Exp Immunol.* 2002;127:436–44.
16. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med.* 2002;252:283–94.
17. Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand.* 2001;173:35–43.
18. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894–7.
19. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2:275–81.
20. Deo R, Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Meo Neto J, de P, Morrow DA, et al. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1812–8.
21. Traore K, Sharma RB, Burek CL, Trush MA. Role of ROS and MAPK in TPA-induced ICAM-1 expression in the myeloid ML-1 cell line. *J Cell Biochem.* 2007;100:1010–21.
22. Traore K, Trush MA, George Jr M, Spannhake EW, Anderson W, Asseffa A. Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. *Leuk Res.* 2005;29:863–79.
23. Ashida N, Arai H, Yamasaki M, Kita T. Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 2001;276:16555–60.
24. Gómez-Garre D, Fernández-Cruz A. Estatinas en prevención primaria: ensayos clínicos e implicaciones. En: Tuñón J, Egido J, editors. *Endotelio Vascular y Estatinas,* II. Madrid: Línea de Comunicación; 2005. p. 33–51.
25. Casasnovas J, León M, Ferreira I. Estatinas en la prevención secundaria de la cardiopatía isquémica: ensayos clínicos e implicaciones. En: Tuñón J, Egido J, editors. *Endotelio Vascular y Estatinas,* II. Madrid: Línea de Comunicación; 2005. p. 53–69.
26. Ortego M, Gómez-Hernández A, Vidal C, Sánchez-Galán E, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce I kappa B kinase activity induced by oxidative stress in monocytes and vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45:468–75.
27. Gómez-Garre D, Herranz M, González-Rubio ML, Bernal R, Aragoncillo P, Carbonell A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in auricular tissue from heart failure patients. *Eur J Heart Fail.* 2006;8:154–61.
28. Gómez-Garre D, González-Rubio ML, Muñoz-Pacheco P, Caro-Vadillo A, Aragoncillo P, Fernández-Cruz A. Rosuvastatin added to standard heart failure therapy improves cardiac remodelling in heart failure rats with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail.* 2010;12:903–12.
29. Pozo M, de Nicolás R, Egido J, González-Cabrero J. Simvastatin inhibits the migration and adhesion of monocytic cells and disorganizes the cytoskeleton of activated endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2006;548:53–63.
30. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, de Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, et al. Elevated ICAM-1 and MCP-1 plasma levels in subjects at high cardiovascular risk are diminished by atorvastatin treatment. Atorvastatin on Inflammatory Markers study: a substudy of Achieve Cholesterol Targets Fast with Atorvastatin Stratified Titration. *Am Heart J.* 2007;153:881–8.
31. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto Jr AM, Kastelein JJ, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.* 2008;359:2195–207.
32. Kalogirou M, Tsimihodimos V, Elisaf M. Pleiotropic effects of ezetimibe: do they really exist? *Eur J Pharmacol.* 2010;633:62–70.
33. McKenney JM, Farnier M, Lo KW, Bays HE, Perevozkaya I, Carlson G, et al. Safety and efficacy of long-term co-administration of fenofibrate and ezetimibe in patients with mixed hyperlipidemia. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:1584–7.
34. Kramer W, Girbig F, Corsiero D, Pfenninger A, Frick W, Jahne G, et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem.* 2005;280:1306–20.
35. Bauvois B, Dauzon D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev.* 2006;26:88–130.
36. Santos AN, Langner J, Herrmann M, Riemann D. Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol.* 2000;201:22–32.
37. Orso E, Werner T, Wolf Z, Bandulik S, Kramer W, Schmitz G. Ezetimib influences the expression of raft-associated antigens in human monocytes. *Cytometry A.* 2006;69:206–8.
38. Halleck M, Davis HR, Kirschmeier P, Levitan D, Snyder RD, Treinen K, et al. An assessment of the carcinogenic potential of ezetimibe using nonclinical data in a weight-of-evidence approach. *Toxicology.* 2009;258:116–30.