

# Efecto de la expresión de la PTEC, el gemfibrozilo y la rosiglitazona en el transporte inverso de colesterol desde macrófagos a heces *in vivo*

Noemí Rotllan<sup>a,b</sup>, Joan Carles Escolà-Gil<sup>a,b</sup>, Laura Calpe-Berdiel<sup>a</sup> y Francisco Blanco Vaca<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Servei de Bioquímica i Institut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

<sup>b</sup>CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas. CIBERDEM. Barcelona. España.

<sup>c</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

**Introducción.** La expresión de PTEC humana en ratones transgénicos reduce el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y aumenta la susceptibilidad a la arteriosclerosis. Por otro lado, el gemfibrozilo, uno de los fibratos más utilizados en clínica, y la rosiglitazona aumentan el cHDL y reducen la susceptibilidad a la arteriosclerosis en modelos murinos. El objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto de la expresión de la PTEC humana, el gemfibrozilo y la rosiglitazona en el transporte inverso de colesterol (TIC) específico de macrófagos.

**Materiales y método.** Para determinar el TIC específico de macrófagos se aplicó inyección intraperitoneal de macrófagos P388D1 marcados con <sup>3</sup>H-colesterol en ratones controles (C57BL/6) y ratones transgénicos de PTEC humana. Este mismo proceso se realizó en ratones transgénicos de apoA-I humana (h) que recibieron una dosis diaria por vía oral de gemfibrozilo (625 mg/kg) o rosiglitazona (10 mg/kg) durante 17 días y se los

comparó con los que recibieron la solución vehículo. A las 48 h, se sacrificó a los animales y se determinó el <sup>3</sup>H-colesterol en plasma, hígado y heces.

**Resultados.** Los ratones transgénicos de PTEC humana presentaron una disminución significativa de cHDL en plasma respecto a los ratones controles. El gemfibrozilo incrementó el colesterol total y el cHDL en los ratones transgénicos de apoA-Ih. Sin embargo, ni la expresión de PTEC humana ni los tratamientos farmacológicos alteraron la excreción fecal de colesterol y ácidos biliares. No se encontraron diferencias significativas en el TIC de <sup>3</sup>H-colesterol desde los macrófagos P388D1 a heces en los diferentes grupos experimentales.

**Conclusiones.** Ni la expresión de PTEC humana en ratones transgénicos ni el tratamiento con gemfibrozilo o rosiglitazona en ratones transgénicos de apoA-Ih modifican el transporte inverso de colesterol específico de macrófagos *in vivo*.

**Palabras clave:**

Proteína transferidora de ésteres de colesterol. Fibratos y glitazonas. PPAR $\gamma$ . PPAR $\alpha$ . HDL.

Este estudio ha sido financiado gracias a una beca para investigación básica de la Sociedad/Fundación Española de Arteriosclerosis 2006 a FBV. NR es investigadora en formación del FIS (FI05/00221). CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas es un proyecto del Instituto de Salud Carlos III.

Correspondencia: Dr. F. Blanco-Vaca.

Servei de Bioquímica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España.

Correo electrónico: fblancova@santpau.cat

Recibido el 20 de mayo de 2009 y aceptado el 3 de julio de 2009.

THE EFFECT OF HUMAN CETP ACTIVITY, GEMFIBROZIL AND ROSIGLITAZONE ON MACROPHAGE-SPECIFIC REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT *IN VIVO*

**Background.** Human CETP expression in mice reduces cholesterol from high density lipoprotein

(HDLc) and increases atherosclerosis susceptibility. On the other hand, gemfibrozil, one of the most used fibrates in clinical practice, and rosiglitazone, increase HDLc and reduce the atherosclerotic susceptibility in mouse models of atherosclerosis. The main aim of this study was to evaluate the effect of human CETP expression, and the effect of gemfibrozil or rosiglitazone treatment on one of the most important HDL anti-atherogenic properties, the macrophage-specific reverse cholesterol transport (RCT).

**Materials and method.** To determinate the macrophage-specific RCT, [<sup>3</sup>H]cholesterol-labelled P388D1 macrophages were injected intraperitoneally into control mice (C57BL/6) and into human CETP transgenic mice. We performed the same procedure in human apoA-I transgenic mice treated during 17 days with an oral daily gavage dose of gemfibrozil (625 mg/kg), rosiglitazone (10 mg/kg) or vehicle solution. At 48 h, the mice were euthanized and [<sup>3</sup>H]cholesterol in plasma, liver and faeces were measured.

**Results.** Human CETP transgenic mice showed decreased HDLc compared to control mice. Human apoA-I transgenic mice showed an increase in total cholesterol and HDLc when treated with gemfibrozil, but not with rosiglitazone. Neither the human CETP activity, nor either of the two pharmacological treatments altered faecal cholesterol or bile acid excretion. Furthermore, the [<sup>3</sup>H]tracer detected in liver, faecal cholesterol and bile acid was not significantly different in any of the animal groups.

**Conclusions.** Neither human CETP expression in transgenic mice, nor treatment with gemfibrozil or rosiglitazone in human apoA-I transgenic mice modified macrophage-specific reverse cholesterol transport.

**Key words:**

Cholesteryl ester transfer protein. Fibrates. Glitazones. PPAR $\gamma$ . PPAR $\alpha$ . HDL.

Los estudios epidemiológicos han demostrado consistentemente que las concentraciones de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y de la apolipoproteína (apo) A-I están correlacionadas inversamente con la incidencia de enfermedad coronaria<sup>1</sup>. Los efectos cardioprotectores de las HDL han sido atribuidos, en parte, a su papel en el transporte inverso de colesterol (TIC) desde los tejidos periféricos al hígado, de donde es parcialmente

excretado a través de la bilis y las heces<sup>1</sup>. Por su importancia en la arteriosclerosis, el TIC específico de macrófagos puede ser especialmente importante para la función antiaterogénica de las HDL<sup>2</sup>.

La acción de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (PTEC) en humanos tiene como resultado la transferencia neta de ésteres de colesterol a las partículas ricas en triglicéridos, al mismo tiempo que la transferencia de triglicéridos hacia las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y HDL<sup>3</sup>. Los ratones no tienen esta actividad proteínica en plasma. La sobreexpresión de PTEC humana o de macaco en ratones transgénicos reduce el cHDL<sup>4,6</sup> e incrementa la pre $\beta$ -HDL<sup>7</sup>. Sin embargo, la magnitud del flujo de colesterol desde la periferia al hígado y su posterior excreción biliar y fecal no parece estar alterada en ratones transgénicos de PTEC de macaco o humana<sup>8-10</sup>. Desde que se caracterizó la PTEC, se ha discutido ampliamente su posible relación con la arteriosclerosis<sup>11</sup>. Los ratones transgénicos de PTEC humana o de macaco alimentados con una dieta aterogénica o cruzados con ratones modificados genéticamente por inactivación del gen del receptor de LDL o del gen de la apoE presentan un incremento en el tamaño de la lesión arteriosclerótica<sup>12-14</sup>. Sin embargo, la expresión de PTEC en ratones transgénicos de apoCIII o de LCAT, en ratones *db/db* y en ratones deficientes de SR-BI reduce el área de la lesión arteriosclerótica<sup>13,15-17</sup>. En la actualidad se desconoce si estas diferencias pueden ser explicadas por diferentes efectos en el TIC específico de macrófagos o son debidas a diferencias en otros mecanismos antiaterogénicos de la HDL. Tampoco está totalmente aclarado si la deficiencia genética de PTEC en humanos protege o no de sufrir enfermedades aterotrombóticas<sup>1,18</sup>. Más recientemente, el estudio ILLUMINATE tuvo que ser interrumpido debido a un incremento en la tasa de mortalidad cardiovascular y total en los pacientes tratados con torcetrapib, un inhibidor de la actividad PTEC, a pesar de inducir un aumento muy notable del cHDL<sup>19</sup>.

Los receptores activados por los proliferadores peroxisomales (PPAR) son factores de transcripción activados por ligandos que afectan a la expresión de varios genes implicados en el metabolismo lipoproteínico, de la glucosa y en la inflamación<sup>20</sup>. Aparte de sus ligandos naturales, diversos compuestos sintéticos pueden activar los diferentes tipos de PPAR<sup>21</sup>. Los fibratos son fármacos activadores de PPAR $\alpha$ . Diversos ensayos clínicos avalan la eficacia de la utilidad de los fibratos en incrementar el cHDL y en reducir los eventos cardiovasculares<sup>1</sup>. Este efecto beneficioso se ha asociado, en par-

te, al aumento de cHDL, así como a la reducción de triglicéridos que inducen estos fármacos. La activación de PPAR $\alpha$  en macrófagos estimula la expresión de LXR y propicia la expresión del transportador ABCA1<sup>22</sup> y, por lo tanto, el eflujo de colesterol a HDL. También se ha indicado que la activación de PPAR $\alpha$  en macrófagos estimula la expresión de SR-BI y reduce la actividad de esterificación del colesterol por ACAT<sup>1</sup>, evitando así la acumulación de ésteres de colesterol<sup>23</sup>. Adicionalmente, la activación de PPAR $\alpha$  en el hígado podría estimular la excreción de colesterol al canalículo biliar mediante un aumento en la expresión de los transportadores ABCG5 y G8<sup>24</sup>. Por otra parte, las glitazonas actúan mayoritariamente a través de los receptores PPAR $\gamma$ , modificando la transcripción de genes implicados en la diferenciación de adipocitos y en el metabolismo lipídico y de la glucosa<sup>1</sup>. La terapia con glitazonas incrementa moderadamente el cHDL<sup>25</sup>, mientras que la inactivación de PPAR $\gamma$  en macrófagos reduce la eliminación de colesterol intracelular mediada por HDL<sup>26</sup>. Se ha indicado que las glitazonas pueden actuar como inductores de ABCA1<sup>27</sup> y también de ABCG1 a través de LXR $\alpha$ <sup>28</sup>, aunque estos cambios no han sido observados en otros estudios<sup>22,26</sup>. Más recientemente, se ha demostrado que la activación de PPAR $\gamma$  inhibe la formación de células espumosas *in vivo* a través de ABCG1 y de forma independiente de ABCA1<sup>22</sup>.

Sin embargo, no hay estudios que evalúen la influencia de la expresión de PTEC humana o del tratamiento con gemfibrozilo o rosiglitazona en el TIC desde macrófagos a heces *in vivo*. Por ello, el objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto de dichas intervenciones en esta propiedad antiaterogénica de las HDL.

## Materiales y métodos

### Animales, dietas y tratamientos

Los procesos de experimentación en animales fueron aprobados por el Comité de Ética Animal del Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. Los estudios se realizaron con ratones C57BL/6 (controles), sin actividad PTEC, ratones transgénicos de PTEC humana con un *background* C57BL/6, obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, #003904) de 10-12 semanas de edad. Para los experimentos con gemfibrozilo y rosiglitazona se utilizaron ratones transgénicos de apoA-I humana con un *background* C57BL/6, de 4-6 meses de edad, obtenidos también de Jackson Laboratory (Bar Harbour, #001927), ya que se ha descrito que los fibratos tienen un efecto inductor en la expresión de apoA-I humana, mientras que disminuyen la expresión de apoA-I de ratón<sup>29</sup>. Los ratones fueron alimentados con dieta estándar (A04 Rodent standard diet, Panlab) y mantenidos bajo condiciones óptimas de temperatura (21 °C) y humedad relativa

(55%), con ciclos programados de luz-oscuridad de 12 h y con libre acceso a agua. Los ratones transgénicos de apoA-I humana fueron tratados durante 17 días con una dosis intragástrica de gemfibrozilo (Sigma, 625 mg/kg), rosiglitazona (GlaxoSmith-Kline, 10 mg/kg) o solución vehículo (0,05% v/v Tween 80 [Sigma], 9,95% v/v PEG 400 [Sigma] y 0,9% w/v de carboximetilcelulosa [Sigma]). Estas dosis fueron seleccionadas por su efecto demostrado tanto en el cHDL como en la susceptibilidad a la arteriosclerosis en ratones modificados genéticamente<sup>29,30</sup>.

### Parámetros lipídicos y fecales

Las concentraciones de colesterol, triglicéridos y cHDL en plasma se determinaron mediante un método comercial de tipo enzimático-colorimétrico adaptado a un autoanalizador Hitachi 911 (Roche Diagnostics)<sup>31,32</sup>. La concentración plasmática de apoA-I fue determinada mediante un ensayo inmunonefelométrico en el que se utilizan anticuerpos policlonales específicos<sup>33</sup>. La actividad PTEC humana se determinó a partir de la transferencia de oleato de colesterol radiactivo de las HDL a las LDL, usando para ello lipoproteínas aisladas de *pooles* de individuos normolipémicos y plasma de ratón como fuente de PTEC<sup>32</sup>. Se recogieron las heces de ratones colocados en jaulas metabólicas individuales durante 48 h y en los que también se controló la ingesta. Se realizó una extracción lipídica a partir de 1 g de heces con 10 ml hexano:isopropanol (3:2 v/v) y se calculó la excreción fecal de colesterol<sup>34</sup>. A partir de 1 g de heces se realizó una extracción con etanol para separar las sales biliares, que fueron determinadas con el método de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) (Sigma Diagnostic). Dicho método enzimático consiste en la determinación por absorbancia a 530 nm del formazán, último producto de la reacción y cuya intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de ácidos biliares de la muestra.

### Cultivos celulares y determinación del TIC específico de macrófagos *in vivo*

Se utilizaron macrófagos P388D1 cultivados en placas de 75 cm con una densidad de 15 millones de células por placa. Estos fueron incubados durante 48 h con medio RPMI 1640 que contenía 5  $\mu$ Ci/ml de [1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ (n)-<sup>3</sup>H]colesterol (Amersham Biosciences Europe GmbH), 100  $\mu$ g/ml de LDL acetilada y el 10% de suero humano libre de lipoproteínas<sup>35</sup>. Estas células se aislaron, equilibraron con albúmina sérica bovina y se resuspendieron en 0,9% (w/v) de suero fisiológico<sup>35</sup>. Los macrófagos marcados con <sup>3</sup>H-colesterol fueron inyectados intraperitonealmente a los ratones de cada uno de los grupos. Concretamente, en la determinación del TIC en los ratones transgénicos de PTEC humana se utilizaron 8 ratones controles C57BL/6 y 6 ratones transgénicos de PTEC humana. El número de células y el número de cuentas por minuto (cpm) inyectadas en cada ratón fueron 1,2  $\times$  10<sup>6</sup> y 1,4  $\times$  10<sup>6</sup>, respectivamente. En la determinación del TIC en los ratones transgénicos de apoA-I humana se utilizaron 12 ratones controles C57BL/6 y 10 ratones transgénicos de apoA-I humana tratados con gemfibrozilo y 10 ratones transgénicos de apoA-I humana tratados con rosiglitazona. En este caso, el número de células y el de cpm inyectadas en cada ratón fueron 1,8  $\times$  10<sup>6</sup> y 1,36  $\times$  10<sup>6</sup>, respectivamente. Una vez inyectados intraperitonealmente los macrófagos marcados radiactivamente, los ratones fueron colocados en jaulas individuales y las heces recogidas durante 48 h. En ese momento, los ratones fueron sacrificados y los hígados aislados. El número de cpm en el plasma se determinó a las 48 h en un contador de centelleo<sup>35,36</sup>. Las extracciones lipí-

dicas de hígados y heces se realizaron con alcohol isopropílico y hexano<sup>35</sup>, donde posteriormente se determinaron las concentraciones de <sup>3</sup>H-colesterol. El <sup>3</sup>H-colesterol se expresó también como fracción de la dosis inyectada<sup>35,36</sup>.

### Análisis estadístico

Se utilizó el análisis estadístico *one-way* ANOVA para comparar las diferencias entre grupos experimentales. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software). Se consideró estadísticamente significativo el valor de  $p < 0,05$ . Todos los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar.

### Resultados

Los ratones transgénicos de PTEC humana presentaban una actividad PTEC 1,5 veces mayor que la que presentan humanos normolipémicos (la actividad media en humanos normolipémicos es de 120  $\mu\text{mol/h}$ )<sup>37</sup>. No se observaron diferencias significativas en el colesterol total de ratones controles y ratones transgénicos de PTEC humana, pero sí se evidenció una disminución significativa en la concentración del cHDL en los ratones transgénicos de PTEC humana, respecto de los ratones controles,

tal y como se ha descrito previamente<sup>4</sup> (tabla 1). El tratamiento con gemfibrozilo incrementó significativamente las concentraciones del colesterol total y del cHDL en los ratones transgénicos de apoA-I respecto de los ratones controles, pero dichos cambios no se observaron con el tratamiento con rosiglitazona (tabla 2). Ambos tratamientos, gemfibrozilo y rosiglitazona, disminuyeron significativamente la concentración de triglicéridos. La expresión de PTEC y el tratamiento con gemfibrozilo o rosiglitazona no alteró la ingesta de colesterol de la dieta ni la excreción fecal de colesterol y ácidos biliares (tablas 1 y 2).

Después de la inyección intraperitoneal de los macrófagos marcados con <sup>3</sup>H-colesterol en los ratones transgénicos de PTEC humana, y a pesar de la disminución de cHDL que presentaban, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de <sup>3</sup>H-colesterol que llegó al plasma, el hígado o las heces, en comparación con los ratones control (fig. 1). Por otro lado, se observó una disminución del <sup>3</sup>H-colesterol en plasma de 48 h de los ratones

**Tabla 1. Parámetros lipídicos y fecales en ratones controles y transgénicos de PTEC humana a las 10-12 semanas de edad**

	Controles (n = 12)	PTEC humana (n = 6)
Peso (g)	23,6 $\pm$ 1,2	22,0 $\pm$ 1,3
Colesterol total (mmol/l)	1,7 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2
cHDL (mmol/l)	1,3 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1*
Actividad PTEC humana ( $\mu\text{mol/h}$ )	ND	183,1 $\pm$ 30
Ingesta de colesterol ( $\mu\text{mol/día/100 g de peso}$ )	21,1 $\pm$ 1,1	24,1 $\pm$ 1,2
Excreción fecal de colesterol ( $\mu\text{mol/día/100 g de peso}$ )	14,4 $\pm$ 1,3	16,9 $\pm$ 1,3
Excreción fecal de ácidos biliares ( $\mu\text{mol/día/100 g de peso}$ )	1,8 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2

cHDL: colesterol de las lipoproteínas de alta densidad; ND: no detectado.

Resultados expresados como media  $\pm$  error estándar.

\* $p < 0,05$ .

**Tabla 2. Parámetros lipídicos y fecales en ratones controles y transgénicos de ApoA-I humana (apoA-Ih) de 4-6 meses de edad tratados con la solución vehículo, gemfibrozilo o rosiglitazona durante 17 días**

	Vehículo (n = 14)	Gemfibrozilo (n = 17)	Rosiglitazona (n = 15)
Peso (g)	30,7 $\pm$ 0,9	30,5 $\pm$ 0,7	30,7 $\pm$ 0,7
Colesterol total (mmol/l)	4,9 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,4*	4,2 $\pm$ 0,2
cHDL (mmol/l)	3,9 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,4*	3,3 $\pm$ 0,2
ApoA-Ih (g/l)	5,8 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,3
Triglicéridos (mmol/l)	2,1 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2 *	1,2 $\pm$ 0,2*
Ingesta de colesterol ( $\mu\text{mol/día/100 g de peso}$ )	17,5 $\pm$ 3,0	17,6 $\pm$ 0,9	18,7 $\pm$ 1,6
Excreción fecal de colesterol ( $\mu\text{mol/día/100 g de peso}$ )	11,5 $\pm$ 1,5	11,9 $\pm$ 1,1	13,6 $\pm$ 1,0
Excreción fecal de ácidos biliares ( $\mu\text{mol/día/100 g de peso}$ )	3,6 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,4

cHDL: colesterol de las lipoproteínas de alta densidad.

Resultados expresados como media  $\pm$  error estándar.

\* $p < 0,05$  respecto a vehículo.

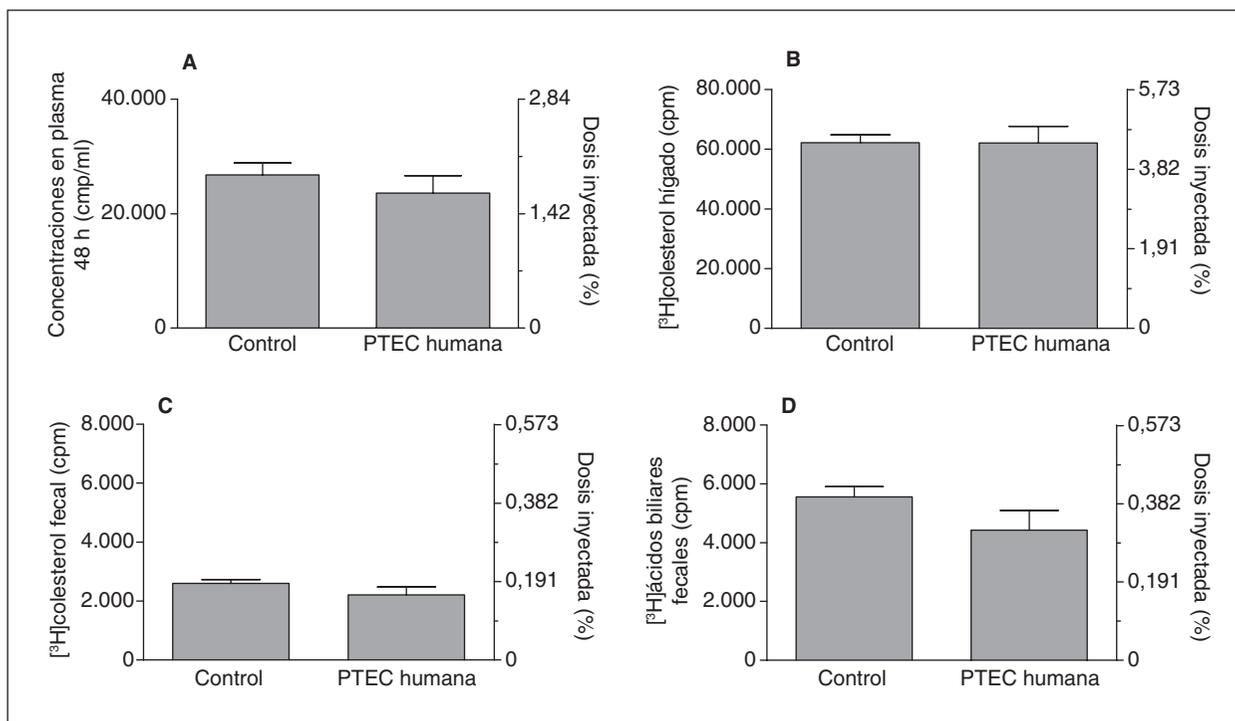


Figura 1. Transporte inverso de colesterol específico de macrófagos a heces en ratones controles (n = 8) y transgénicos de PTEC humana (n = 6). A: concentraciones de <sup>3</sup>H-colesterol total en plasma a las 48 h. B: concentraciones de <sup>3</sup>H-colesterol en hígado. C y D: concentraciones de <sup>3</sup>H-colesterol y <sup>3</sup>H-ácidos biliares, respectivamente, en heces a las 48 h de la inyección de macrófagos marcados. Los valores se expresan como media ± error estándar.

transgénicos de apoA-I humana tratados con rosiglitazona respecto de los controles ( $37.550 \pm 1.360$  frente a  $41.560 \pm 1.277$  cpm;  $p = 0,045$ ), cosa que no sucedió con los ratones transgénicos de apoA-I humana tratados con gemfibrozilo. Sin embargo, tampoco la rosiglitazona ni el gemfibrozilo alteraron el TIC de <sup>3</sup>H-colesterol de macrófagos a hígado y heces (fig. 2). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de <sup>3</sup>H-ácidos biliares entre ambos tratamientos (gemfibrozilo o rosiglitazona) respecto a la solución vehículo, aunque sí se observó una tendencia no significativa a aumentar en los ratones tratados con rosiglitazona ( $5.736 \pm 597$  cpm) respecto de los ratones controles ( $4.040 \pm 670$  cpm).

## Discusión

La teoría de que el aumento del cHDL conduciría, inevitablemente, a la disminución de la enfermedad cardiovascular ha sufrido un duro golpe con la publicación de los datos del estudio ILLUMINATE, aun cuando los efectos negativos producidos por el torcetrapib puedan ser debidos a efectos negativos específicos del fármaco<sup>19</sup>. Así pues, pudiera estar indicado no sólo incrementar la concentra-

ción de cHDL, sino sobre todo mejorar la funcionalidad de las HDL<sup>2,38</sup>.

El TIC específico de macrófagos parece ser especialmente importante para la función antiaterogénica de las HDL<sup>2</sup>. En este estudio, hemos determinado el TIC específico de macrófagos, que es la principal célula que acumula colesterol en las lesiones arterioscleróticas, determinando la cantidad de <sup>3</sup>H-colesterol transportado desde los macrófagos a las heces *in vivo*<sup>39</sup>. Cabe destacar que el transporte de colesterol centrípeto desde tejidos extrahepáticos o la excreción fecal de colesterol es una medida del TIC total, pero no refleja necesariamente el TIC específico de macrófagos<sup>40-42</sup> puesto que este último tan sólo representa el 2% del TIC total. Por lo tanto, los resultados cualitativos (aumento o descenso) de dicho TIC específico de macrófagos no tienen por qué necesariamente coincidir con los datos del TIC total.

Los resultados de nuestro estudio demuestran que el TIC desde macrófagos a heces no se modificó en ratones transgénicos de PTEC humana ni en ratones transgénicos de apoA-I humana tratados con gemfibrozilo o rosiglitazona, a pesar de la reducción y del incremento, respectivamente, del

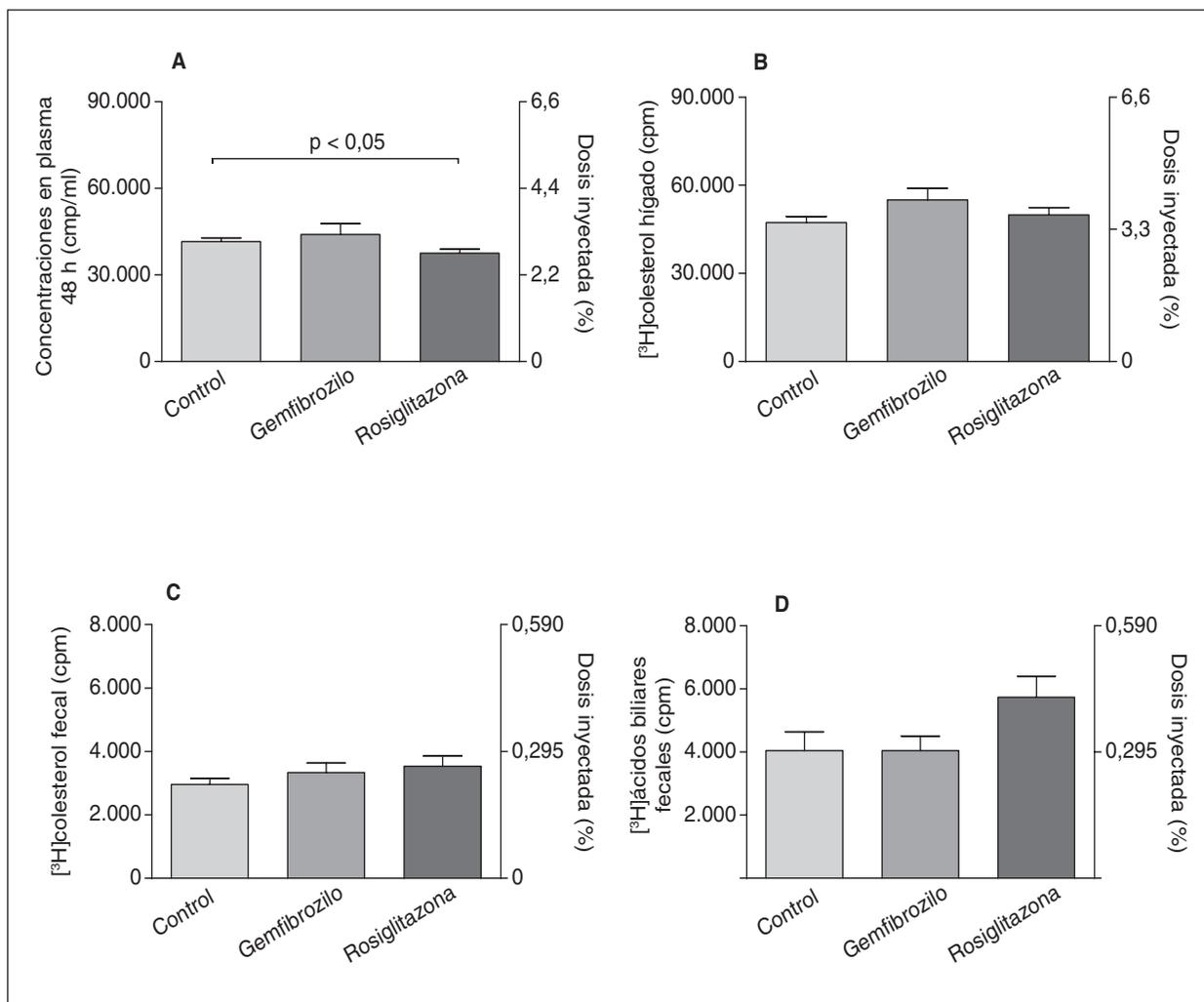


Figura 2. Transporte inverso de colesterol específico de macrófagos a heces en ratones controles (n = 12) y transgénicos de apoA-I humana (n = 10). A: concentraciones de <sup>3</sup>H-colesterol total en plasma a las 48 h. B: concentraciones de <sup>3</sup>H-colesterol en hígado. C y D: concentraciones de <sup>3</sup>H-colesterol y <sup>3</sup>H-ácidos biliares, respectivamente, en heces a las 48 h de la inyección de macrófagos marcados. Los valores se expresan como media ± error estándar.

cHDL que se observó durante estas intervenciones. Estos resultados podrían parecer, en principio, sorprendentes ya que se podría pensar que los cambios en el cHDL deberían estar asociados a cambios en el TIC total o en el específico de macrófagos. Sin embargo, buena parte de los estudios realizados en ratones modificados genéticamente no han encontrado los cambios esperados en el TIC de macrófagos a partir de las modificaciones existentes en la concentración plasmática de cHDL<sup>2,8-10,43,44</sup>.

Se ha descrito que la acción de los fibratos y glitazonas sobre los PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , respectivamente, estimula el eflujo de colesterol *in vitro* desde los macrófagos a través de LXR, que activa la expresi

ón de *ABCA1* y otros genes involucrados en el eflujo de colesterol, como *ABCG1*<sup>27,45</sup>. Por otro lado, la acción de la PTEC disminuye el eflujo del colesterol a HDL maduras<sup>46</sup>. Por lo tanto, basándonos en estos datos, podríamos haber hipotetizado que el tratamiento con gemfibrozilo o rosiglitazona aumentaría el TIC específico de macrófagos, mientras que la hiperexpresión de PTEC humana podría disminuirlo. Sin embargo, el TIC específico de macrófagos a heces *in vivo* no sólo está regulado por el eflujo de colesterol, sino también por el catabolismo del cHDL y la excreción hepatobiliar de colesterol y ácidos biliares, así como por su reabsorción intestinal. Por lo tanto, pueden presentarse cambios en estos campos que atenúen o anulen el efec

to del primer paso de la vía del TIC específico de macrófagos. Así, por ejemplo, el aumento de la expresión de apoA-I humana o la activación de LXR altera no sólo el eflujo de colesterol desde macrófagos, sino también el catabolismo de las HDL y la excreción hepatobiliar del colesterol y, consecuentemente, incrementa el TIC desde macrófagos a plasma, hígado y heces *in vivo*<sup>24,39,47,48</sup>. Es destacable que el gemfibrozilo, a pesar de aumentar la concentración del cHDL, no altera la expresión de apoA-I. Estos datos coinciden con los datos de Staels et al y podrían indicar que el gemfibrozilo actúa como un agonista parcial de PPAR $\alpha$  produciendo un efecto marginal en la concentración plasmática de apoA-I<sup>29</sup>. En el caso de la rosiglitazona, encontramos una disminución en la cantidad de colesterol marcado radiactivamente en plasma que podría ser debido a cambios en la remodelación y el catabolismo de las HDL<sup>26</sup>. A pesar de esta disminución en la cantidad de <sup>3</sup>H-colesterol en plasma, no se encontraron diferencias en hígado ni en heces. En este sentido, es conocido que la concentración en plasma del colesterol marcado radiactivamente y derivado de macrófagos no es por sí misma un marcador del flujo a través del compartimento plasmático y, como se ha comentado anteriormente, la captación en hígado del cHDL y la excreción biliar también influyen en el TIC específico de macrófagos<sup>49</sup>.

En conclusión, ni la expresión de PTEC humana en ratones ni el tratamiento con gemfibrozilo o rosiglitazona producen cambios en el TIC específico de macrófagos. Por lo tanto, el posible efecto antiaterogénico de la inhibición de PTEC y la acción antiaterogénica de gemfibrozilo y rosiglitazona no parecen funcionar a través de esta vía.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

1. Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4:193-205.
2. Escolá-Gil JC, Rotllan N, Julve J, Blanco-Vaca F. In vivo macrophage-specific RCT and antioxidant and antiinflammatory HDL activity measurements: New tools for predicting HDL atheroprotection. *Atherosclerosis*. 2009;206:321-7.
3. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*. 1993;34:1255-74.
4. Agellon LB, Walsh A, Hayek T, Moulin P, Jiang XC, Shelanski SA, et al. Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J Biol Chem*. 1991;266:10796-801.
5. Marotti KR, Castle CK, Murray RW, Rehberg EF, Polites HG, Melchior GW. The role of cholesteryl ester transfer protein in primate

- apolipoprotein A-I metabolism. *Insights from studies with transgenic mice. Arterioscler Thromb*. 1992;12:736-44.
6. Melchior GW, Castle CK, Murray RW, Blake WL, Dinh DM, Marotti KR. Apolipoprotein A-I metabolism in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. Insights into the mechanisms responsible for low plasma high density lipoprotein levels. *J Biol Chem*. 1994;269:8044-51.
7. Francone OL, Royer L, Haghpassand M. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J Lipid Res*. 1996;37:1268-77.
8. Osono Y, Woollett LA, Marotti KR, Melchior GW, Dietschy JM. Centripetal cholesterol flux from extrahepatic organs to the liver is independent of the concentration of high density lipoprotein-cholesterol in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:4114-9.
9. Alam K, Meidell RS, Spady DK. Effect of up-regulating individual steps in the reverse cholesterol transport pathway on reverse cholesterol transport in normolipidemic mice. *J Biol Chem*. 2001;276:15641-9.
10. Harada LM, Amigo L, Cazita PM, Salerno AG, Rigotti AA, Quintao EC, et al. CETP expression enhances liver HDL-cholesteryl ester uptake but does not alter VLDL and biliary lipid secretion. *Atherosclerosis*. 2007;191:313-8.
11. De Grooth GJ, Klerkx AH, Stroes ES, Stalenhoef AF, Kastelein JJ, Kuivenhoven JA. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2004;45:1967-74.
12. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature*. 1993;364:73-5.
13. Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL, et al. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest*. 1995;96:2071-4.
14. Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, Bisgaier CL, Breslow JL, Tall AR. Increased atherosclerosis in ApoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1105-10.
15. Foger B, Chase M, Amar MJ, Vaisman BL, Shamburek RD, Paigen B, et al. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J Biol Chem*. 1999;274:36912-20.
16. MacLean PS, Bower JF, Vadlamudi S, Osborne JN, Bradfield JF, Burden HW, et al. Cholesteryl ester transfer protein expression prevents diet-induced atherosclerotic lesions in male db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1412-5.
17. Harder C, Lau P, Meng A, Whitman SC, McPherson R. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression protects against diet induced atherosclerosis in SR-BI deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:858-64.
18. Curb JD, Abbott RD, Rodriguez BL, Masaki K, Chen R, Sharp DS, et al. A prospective study of HDL-C and cholesteryl ester transfer protein gene mutations and the risk of coronary heart disease in the elderly. *J Lipid Res*. 2004;45:948-53.
19. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007;357:2109-22.
20. Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:245-57.
21. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*. 1998;98:2088-93.
22. Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest*. 2004;114:1564-76.
23. Chinetti G, Lestavel S, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha reduces cholesterol esterification in macrophages. *Circ Res*. 2003;92:212-7.

24. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 2006;113:90-7.
25. Nagashima K, Lopez C, Donovan D, Ngai C, Fontanez N, Bensadoun A, et al. Effects of the PPARgamma agonist pioglitazone on lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2005;115:1323-32.
26. Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, et al. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol*. 2002;22:2607-19.
27. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med*. 2001;7:53-8.
28. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med*. 2001;7:48-52.
29. Duez H, Lefebvre B, Poulain P, Torra IP, Percevault F, Luc G, et al. Regulation of human apoA-I by gemfibrozil and fenofibrate through selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:585-91.
30. Hennuyer N, Tailleux A, Torpier G, Mezdoor H, Fruchart JC, Staels B, et al. PPARalpha, but not PPARgamma, activators decrease macrophage-laden atherosclerotic lesions in a nondiabetic mouse model of mixed dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1897-902.
31. Escola-Gil JC, Julve J, Marzal-Casacuberta A, Ordóñez-Llanos J, González-Sastre F, Blanco-Vaca F. Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 2000;41:1328-38.
32. Escola-Gil JC, Julve J, Marzal-Casacuberta A, Ordóñez-Llanos J, González-Sastre F, Blanco-Vaca F. ApoA-II expression in CETP transgenic mice increases VLDL production and impairs VLDL clearance. *J Lipid Res*. 2001;42:241-8.
33. Ribas V, Palomer X, Roglans N, Rotllan N, Fievet C, Tailleux A, et al. Paradoxical exacerbation of combined hyperlipidemia in human apolipoprotein A-II transgenic mice treated with fenofibrate. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1737:130-7.
34. Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Ribas V, Navarro-Sastre A, Garcés-Garcés J, Blanco-Vaca F. Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet. *Atherosclerosis*. 2005;181:75-85.
35. Rotllan N, Ribas V, Calpe-Berdiel L, Martín-Campos JM, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. Overexpression of human apolipoprotein A-II in transgenic mice does not impair macrophage-specific reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:e128-32.
36. Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Palomer X, Ribas V, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. Direct evidence in vivo of impaired macrophage-specific reverse cholesterol transport in ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1738:6-9.
37. Serrat-Serrat J, Ordóñez-Llanos J, Serra-Grima R, Gómez-Gerique JA, Pellicer-Thoma E, Payes-Romero A, et al. Marathon runners presented lower serum cholesteryl ester transfer activity than sedentary subjects. *Atherosclerosis*. 1993;101:43-9.
38. Millar JS, Duffy D, Gadi R, Bloedon LT, Dunbar RL, Wolfe ML, et al. Potent and selective PPAR-alpha agonist LY518674 upregulates both ApoA-I production and catabolism in human subjects with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:140-6.
39. Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*. 2003;108:661-3.
40. Escola-Gil JC, Calpe-Berdiel L, Palomer X, Ribas V, Ordóñez-Llanos J, Blanco-Vaca F. Antiatherogenic role of high-density lipoproteins: insights from genetically engineered-mice. *Front Biosci*. 2006;11:1328-48.
41. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*. 2006;113:2548-55.
42. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest*. 2006;116:3090-100.
43. Brousseau ME, Diffenderfer MR, Millar JS, Nartsupha C, Asztalos BF, Welty FK, et al. Effects of cholesteryl ester transfer protein inhibition on high-density lipoprotein subspecies, apolipoprotein A-I metabolism, and fecal sterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1057-64.
44. Stein O, Dabach Y, Hollander G, Ben-Naim M, Halperin G, Stein Y. Reverse cholesterol transport in mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Atherosclerosis*. 2002;164:73-8.
45. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*. 2001;7:161-71.
46. Westerterp M, Van der Hoogt CC, De Haan W, Offerman EH, Dallinga-Thie GM, Jukema JW, et al. Cholesteryl ester transfer protein decreases high-density lipoprotein and severely aggravates atherosclerosis in APOE\*3-Leiden mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2552-9.
47. Zanotti I, Poti F, Pedrelli M, Favari E, Moleri E, Franceschini G, et al. The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential. *J Lipid Res*. 2008;49:954-60.
48. Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Fievet C, Roig R, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8. *J Lipid Res*. 2008;49:1904-11.
49. Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*. 2005;115:2870-4.