



Volumen 10, Número 4, Julio 2004

Expertos Invitados

ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GENICA INDUCIDO EN MACROFAGOS EXPUESTOS A LDL OXIDADAS Y AL INHIBIDOR DE LA ACAT AVASIMIBE

Columnista Experto de SIIC
Dra. Gemma Llaverias

Profesora Titular. Farmacología

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en los países industrializados.¹ Entre los factores de riesgo implicados en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis se destacan los niveles elevados de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL).² En este sentido, las estatinas han demostrado ser muy eficaces para corregir las anomalías lipídicas y reducir la mortalidad asociada.³ Sin embargo, en un porcentaje elevado de casos no se consigue reducir el colesterol LDL a los niveles deseados,⁴ por lo que resulta necesaria la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas. Por otra parte, resulta evidente que el tratamiento y la prevención de la enfermedad aterosclerótica deben implicar no sólo la corrección de los factores de riesgo, sino también el control farmacológico directo de los procesos que tienen lugar dentro de la propia pared arterial. Entre estos procesos resulta fundamental la acumulación de ésteres de colesterol en macrófagos mediada por el enzima acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT).⁵ La inhibición de esta enzima constituye una interesante diana terapéutica. Entre los inhibidores de la ACAT más conocidos se halla el compuesto CI- 1011,⁶ sintetizado originalmente por Parke-Davis, actualmente integrada en Pfizer Global Research and Development. Este compuesto, denominado avasimibe, es el inhibidor de la ACAT que se halla en una fase más avanzada de estudios clínicos (fase III).⁷

En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación⁸ demostramos en macrófagos de origen humano que la adición de avasimibe durante el proceso de carga lipídica (incubación simultánea con el fármaco y LDL modificadas por acetilación) producía una disminución, dependiente de la concentración, en el contenido intracelular de ésteres de colesterol. Este efecto no se acompañaba de un incremento en el contenido intracelular de colesterol libre. Teniendo en cuenta la citotoxicidad que se deriva de la acumulación de colesterol libre en macrófagos,⁹⁻¹¹ los resultados anteriores sugieren un mejor perfil de seguridad para avasimibe, en comparación con otros inhibidores de la ACAT.⁷

La exposición de macrófagos a LDL modificadas, que constituyen un entorno proaterógeno y proinflamatorio, produce modificaciones en la expresión de un gran número de genes. Esta alteración en el patrón de expresión génica puede ser modificada, o revertida en cierto grado, por la exposición de dichas células a fármacos como los inhibidores de la ACAT. Hasta el momento, los estudios de modificación de la expresión génica se realizaron, en la mayoría de los casos, a través del estudio individual de un determinado gen o proteína. Sin embargo, probablemente existen numerosos genes cuya participación en el proceso aterosclerótico no se ha identificado todavía. A lo largo de los últimos 10 años se desarrollaron progresivamente tecnologías útiles para el escrutinio de grandes cantidades de genes de manera simultánea. Los *arrays* de ADNc utilizados son comerciales y están constituidos por membranas de nailon en las que se han depositado fragmentos de ADNc que son hibridados a sondas radiactivas [³²P] obtenidas de tejidos o células tratadas en diferentes condiciones. La intensidad de las marcas correspondientes a cada gen es

proporcional al nivel de expresión de este gen en la célula en una situación determinada. En el trabajo que se presenta a continuación se estudió el efecto de avasimibe sobre el perfil de expresión génica en macrófagos THP-1 expuestos simultáneamente al fármaco y a LDL oxidadas, con la finalidad de identificar genes regulados por este fármaco que puedan estar implicados en el desarrollo de la lesión aterosclerótica.

Materiales y métodos

Las células monocíticas THP-1 se diferenciaron a macrófagos por exposición a PMA (0.1 μ M, 24 h). Los macrófagos se trataron durante 24 h con vehículo, LDL oxidadas (100 μ g/ml) o con LDL oxidadas en presencia de avasimibe 2 μ M (donación de Pfizer).

El perfil de expresión génica se analizó por hibridación a *arrays* de ADNc (Atlas Human Cardiovascular Array, BD-Clontech®). Para ello, las células se recogieron y se preparó RNA total mediante el procedimiento recomendado por BD- Clontech®). Las sondas radioactivas de ADNc se prepararon a partir de 5 μ g de RNA total. El RNA se hibridó 2 min a 70°C seguido de 2 min a 50°C con 1 μ l de la mezcla específica de *primers*, correspondiente a los genes presentes en el *array* de ADNc. La reacción de RT se llevó a cabo utilizando MMLV RT y 30 μ Ci de [α -³²P]dATP durante 25 min a 50°C. Después de filtrar los nucleótidos no incorporados a través de columnas de Sephadex G-50, los ADNc marcados se hibridaron a las membranas utilizando ExpressHyb (BD-Clontech®) en un horno de hibridación a 68°C durante la noche. Al día siguiente, las membranas se lavaron y se contactaron con pantallas de europio durante 10 a 14 días. Las pantallas se escanearon con un Phosphorimager (Modelo Storm, de Molecular Dynamics).

La cuantificación se llevó a cabo mediante el programa Atlas Image 2.01 (Clontech) y el análisis mediante el programa GeneSpring 5.0 de Silicon Genetics. Para cada gen, se calculó la intensidad corregida tras restar el fondo. La normalización global de las membranas se realizó por el método de la mediana, aplicando el percentil 50%. La expresión de cada gen se calcula a partir del cociente (*ratio*) del valor obtenido para cada tratamiento en relación al control, después de normalizar los datos. Las listas de restricción se generaron descartando aquellos genes cuya expresión diferencial fuera menor que el doble del *background* mínimo.

Resultados

En primer lugar, con el fin de identificar los genes afectados por la exposición de las células a un entorno proaterógeno, se realizaron incubaciones de los macrófagos con LDL oxidadas (100 μ g/ml, durante 24 horas). Se llevaron a cabo 3 cultivos diferentes, con lotes distintos de células y de LDL oxidadas. Únicamente se consideraron aquellos genes cuya expresión resultó inducida o inhibida más de 2 veces de forma significativa ($p < 0.05$) a partir de los valores de los 3 *arrays* realizados. La exposición a LDL oxidadas inhibió la expresión de 22 genes, mientras que un total de 5 genes resultaron inducidos (Tabla 1). Para validar los resultados obtenidos se analizó la expresión a ARNm por RT-PCR de una serie de genes seleccionados por su potencial relación con el proceso aterosclerótico. Se confirmó que la exposición a LDL oxidadas incrementó 2.3 veces los niveles de ARNm del receptor *scavenger* CD68, 8.5 veces los correspondientes a la FABP4 (*fatty acid binding protein 4*) y redujo un 40% los de la metaloproteínasa 9 (MMP9) (Figura 1).

[Tabla I](#)

Tabla 1. Genes diferencialmente expresados en macrófagos THP-1 tratados con oxLDL. La tabla muestra el nombre y el número de Genbank de los genes que resultaron diferencialmente expresados en células expuestas a LDL oxidadas (tratadas) respecto de las células tratadas con vehículo (control). La tercera columna corresponde a la expresión relativa de cada gen, calculada como la relación entre la intensidad ajustada de las células tratadas respecto de las controles. La última columna indica la categoría funcional a la cual pertenece cada gen. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes realizados con diferentes lotes de células y lipoproteínas.

Figura 1

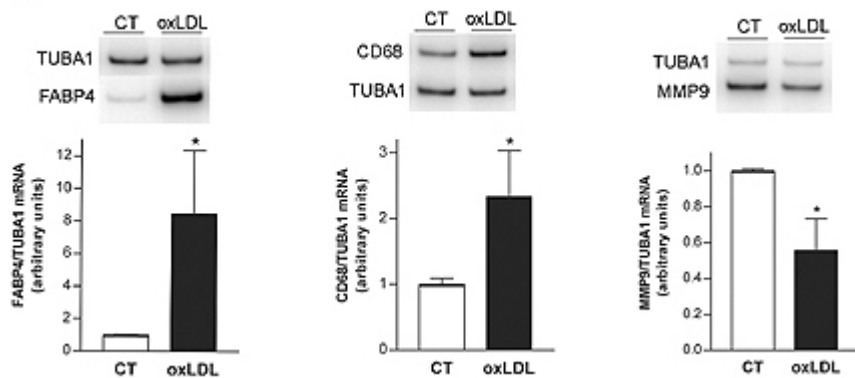


Figura 1. Análisis de los niveles de ARNm de FABP4, CD18 y MMP9 mediante RT-PCR de macrófagos THP-1 tratados con LDL oxidadas durante 24 horas. Se muestra una autorradiografía representativa y la cuantificación de dichos niveles de ARNm normalizados respecto de los del gen de la tubulina 1 (TUBA1). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con diferentes lotes de células y de lipoproteínas. * $p < 0.05$.

Paralelamente se procedió a determinar el efecto del tratamiento de dichas células con avasimibe. El tratamiento con este fármaco produjo una reducción en la expresión de 13 genes, mientras que un total de 4 resultaron inducidos (Tabla 2). El análisis de los niveles de ARNm de FABP4 por RT-PCR confirmó que el avasimibe produce una reducción del 38% en la expresión de dicho gen (Figura 2).

Tabla II

Tabla 2. Genes diferencialmente expresados en macrófagos THP-1 tratados con avasimibe. La tabla muestra el nombre y el número de Genbank de los genes que resultaron diferencialmente expresados en células expuestas a avasimibe (2 μ M durante 24 horas) en presencia de LDL oxidadas (tratadas) respecto de las células incubadas únicamente con estas LDL (control). La tercera columna corresponde a la expresión relativa de cada gen, calculada como la intensidad ajustada de las células tratadas respecto a las controles. La última columna indica la categoría funcional a la cual pertenece cada gen. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes realizados con diferentes lotes de células y lipoproteínas.

Figura 2

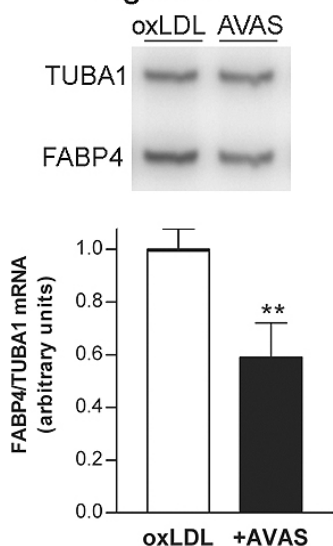


Figura 2. Análisis de los niveles de ARNm de FABP4 mediante RT-PCR de macrófagos THP-1 tratados con avasimibe (2 μ M durante 24 horas) en presencia de LDL oxidadas respecto de las mismas células incubadas únicamente con estas LDL. Se muestra una autorradiografía representativa y la cuantificación de dichos niveles de ARNm normalizados respecto de los del gen de la tubulina 1 (TUBA1). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con diferentes lotes de células y de lipoproteínas. ** $p < 0.01$.

Discusión

El monocito/macrófago es una célula clave en el desarrollo del proceso aterosclerótico.¹² En sus fases iniciales, la captación de lipoproteínas oxidadas conduce a la formación de células espumosas en la pared arterial. Uno de los objetivos del presente estudio era investigar el proceso de aterogénesis desde el punto de vista de la regulación de la expresión génica. Para ello, se realizaron los experimentos en monocitos THP-1, diferenciados a macrófagos tras exposición a ésteres de forbol, un tipo de células ampliamente utilizado como modelo de formación de células espumosas.¹³ El tratamiento de dichas células con LDL oxidadas produjo modificaciones en la expresión de una serie de genes, cuya función podría estar relacionada con la aterosclerosis. Cuando estos genes se clasificaron según su localización celular y su función, se observó que principalmente se producía una inhibición de la expresión de genes que codifican proteínas localizadas en el retículo endoplasmático o dirigidas hacia la zona extracelular (proteínas de membrana o secretadas al medio). Este patrón coincide con el descrito por Andersson y col.¹⁴ en un modelo similar al nuestro.

Entre los genes que resultan inducidos tras la exposición a LDL oxidadas, podemos destacar la glucoproteína de membrana CD68. Se trata de un receptor *scavenger* de clase D, que se expresa únicamente en macrófagos y células dendríticas, capaz de unir e internalizar LDL oxidadas.¹⁵ Recientemente se ha propuesto que CD68 desempeña un papel crucial en la progresión de macrófagos a células espumosas.¹⁶ Otro de los genes regulados por LDL oxidadas es la *fatty acid binding protein 4 (FABP 4)*, también denominada *ap2*. Aunque inicialmente fue identificada en adipocitos, la FABP4 se expresa también en macrófagos.¹⁷ Su expresión resulta incrementada 17 veces, respecto de macrófagos control, según los resultados obtenidos de los *arrays* de ADNc, y 8.4 veces en los estudios realizados por RT-PCR ($p < 0.05$). Nuestros resultados coinciden con los de Fu y col.,¹⁸ que sugieren que el mecanismo por el cual las LDL modificadas inducen la expresión de FABP4 en estas células está relacionado con la activación de la vía de NF- κ B. Se ha visto que FABP4 se halla altamente expresada en macrófagos de lesiones ateroscleróticas de conejos hipercolesterolémicos.¹⁹ Nuestros resultados demuestran que la adición de avasimibe junto con las LDL oxidadas atenúa la inducción de FABP4 producida por dichas lipoproteínas. Así, la relación de la expresión de FABP4 en células tratadas con LDL oxidadas y avasimibe, respecto de células tratadas con LDL oxidadas en ausencia de fármaco es de 0.18 y 0.62 ($p < 0.01$), según los resultados de los *arrays* y de los estudios de RT-PCR, respectivamente. La ausencia de FABP4 en el macrófago protege a los ratones apoE^{-/-} del desarrollo de aterosclerosis.²⁰ Por tanto, la inhibición de la expresión de FABP4 en el macrófago puede representar un nuevo mecanismo de acción antiaterosclerótica directa de avasimibe, que dificultaría la acumulación de colesterol en el macrófago.

Otro gen cuya expresión resulta reducida en macrófagos expuestos a avasimibe y LDL oxidadas es la *HDL binding protein (HBP)* o *vigilin*. Es una proteína de membrana, capaz de unirse a las HDL, aunque no parece comportarse como un receptor de membrana típico.²¹ Aunque su función no está clara, se ha propuesto que participa en el metabolismo intracelular de esteroides. Estudios en conejos han mostrado que HBP se expresa en macrófagos cargados de lípidos, colocalizada con apo E.²² Se ha propuesto que factores similares pueden afectar la expresión de ambos genes en macrófagos. De hecho, nuestros resultados muestran una reducción simultánea en la expresión de HBP y de apo E. Así, la relación de la expresión es de 0.45 y 0.35 para HBP y apo E, respectivamente. El hecho de que HBP se halle expresada en macrófagos de lesiones ateroscleróticas indica que su inhibición tras el tratamiento con avasimibe podría constituir un efecto beneficioso, hasta el momento no descrito para ningún otro fármaco, respecto del desarrollo de la aterosclerosis. Por lo que respecta a la apo E, en general se considera una proteína antiaterogénica. En concreto, la apo E secretada por los macrófagos actúa como un aceptor de colesterol libre que es liberado hacia el exterior de la célula,²³ facilitando el transporte inverso de colesterol. Este papel protector se ha confirmado en estudios en ratones deficientes en apo E, pero cuyos macrófagos sí expresan esta apolipoproteína.²⁴ Estos animales, pese a que presentan niveles circulantes de apo E muy bajos, muestran resistencia al desarrollo de aterosclerosis. La expresión de apo E en el macrófago se halla regulada por los niveles de colesterol.²⁵ Otros autores observaron reducciones en la expresión de apo E en macrófagos tratados con estatinas y atribuyeron este efecto a la reducción del contenido de colesterol intracelular.²⁶ En nuestro caso, el efecto del avasimibe consiste en inhibir la esterificación de colesterol, pero no reduce los niveles de colesterol libre en el interior del macrófago,⁸ por lo que este mecanismo no explicaría la reducción en los niveles de ARNm de apo E. Puede resultar paradójico que fármacos potencialmente antiaterogénicos como estatinas o inhibidores de la ACAT reduzcan la expresión de

una proteína antiaterogénica. Sin embargo, en nuestras condiciones de trabajo, en las que los macrófagos están expuestos a concentraciones muy elevadas de lipoproteínas, la reducción en la secreción de apo E podría representar una respuesta adaptativa destinada a reducir la captación de éstas.

Por último, uno de los procesos implicados directamente en la progresión y desarrollo de la placa de ateroma es la angiogénesis.²⁷ La degradación de la matriz extracelular (ECM) resulta clave en el proceso angiogénico y es llevada a cabo por sistemas proteolíticos como el sistema fibrinolítico (plasminógeno/plasmina) y las metaloproteinasas (MMP).²⁸ Existen puntos de contacto entre ambos sistemas: el activador tisular de plasminógeno (tPA) convierte el plasminógeno en plasmina, la cual puede activar las MMP latentes. Estas son una familia de enzimas encargadas de degradar la ECM, lo cual predispone la placa de ateroma a la ruptura. Todas las células vasculares pueden secretar MMP y, en el caso de los macrófagos, la mayoritaria es la MMP-9.²⁹ La actividad de estas enzimas está regulada no sólo a nivel de expresión génica sino también por los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), principalmente TIMP-1.³⁰ En el presente estudio se demuestra que el tratamiento con avasimibe reduce la expresión de diversos componentes de estos sistemas, como MMP-9, tPA y TIMP-1. La menor expresión de MMP-9 y de tPA sugiere que el avasimibe podría actuar inhibiendo la angiogénesis, lo cual sería beneficioso en cuanto a limitar el desarrollo de la placa de ateroma. Además, la inhibición de la MMP-9 reduciría la degradación de la ECM, ralentizando el proceso de aterogénesis y aumentando la estabilidad de las placas de ateroma ya formadas. Sin embargo, el efecto final de avasimibe sobre la actividad MMP-9 puede resultar contrarrestado por la reducción en la expresión de su inhibidor TIMP-1.

En conclusión, la utilización de técnicas de *array* de ADNc ha permitido identificar nuevos genes potencialmente implicados en el desarrollo de la aterosclerosis, cuya expresión resulta modulada en macrófagos humanos expuestos a LDL oxidadas y al inhibidor de la ACAT avasimibe. Entre los efectos más interesantes obtenidos hasta el momento, se destaca la marcada inducción de la FABP4 por LDL oxidadas, que resulta revertida, al menos en parte, por el tratamiento con avasimibe. La FABP4 presenta altos niveles de expresión en macrófagos de lesiones ateroscleróticas, mientras que la falta de expresión de esta proteína protege respecto del desarrollo de lesiones en modelos animales susceptibles.

BIBLIOGRAFÍA

1. Singh BK, Mehta JL. Management of dyslipidemia in the primary prevention of coronary heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2002;17:503-511.
2. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-2497.
3. Maron DJ, Fazio S, McRae FL. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000;101:207-213.
4. Pearson TA, Laurora I, Chu H et al. The Lipid Treatment Assessment Project (L-TAP): a multicenter survey to evaluate the percentages of dyslipidemic patients receiving lipid-lowering therapy and achieving low-density lipoprotein cholesterol goals. *Arch Intern Med* 2000;160:459-467.
5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500.
6. Lee HT, Sliskovic DR, Picard JA, et al. Inhibitors of acyl-CoA: cholesterol O-acyl transferase (ACAT) as hypocholesterolemic agents. CI-1011: an acyl sulfamate with unique cholesterol-lowering activity in animals fed noncholesterol-supplemented diets. *J Med Chem* 1996;39:5031-5034.
7. Llaverias G, Laguna JC, Alegret M. Pharmacology of the ACAT inhibitor avasimibe (CI-1011). *Cardiovasc Drug Rev* 2003.
8. Llaverias G, Jove M, Vazquez-Carrera M, et al. Avasimibe and atorvastatin synergistically reduce cholesteryl ester content in THP-1 macrophages. *Eur J Pharmacol* 2002;451:11-17.
9. Warner GJ, Stoudt G, Bamberger M, et al. Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. *J Biol Chem* 1995;270:5772-5778.
10. Kellner-Weibel G, Jerome WG, Small D et al. Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:423-431.
11. Perrey S, Legendre C, Matsuura A, et al. Preferential pharmacological inhibition of macrophage ACAT increases plaque formation in mouse and rabbit models of atherogenesis. *Atherosclerosis* 2001;155:359-370.
12. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 2002;8:1235-1242.
13. Auwerx J. The human leukemia cell line THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991;47:22-31.

14. Andersson T, Boräng S, Larsson M, et al. Novel candidate genes for atherosclerosis are identified by representational difference analysis-based transcript profiling of cholesterol-loaded macrophages. *Pathobiology* 2001;69:304- 314.
15. Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clin Chim Acta* 1999;286:191-205.
16. Tsukamoto K, Kinoshita M, Kojima K, et al. Synergically increased expression of CD36, CLA-1 and CD68, but not of SR-A and LOX-1, with the progression to foam cells from macrophages. *J Atheroscler Thromb* 2002;9:57-64.
17. Cabrero A, Cubero M, Llaverias G, et al. Differential effects of peroxisome proliferator-activated receptor activators on the ARNm level of genes involved in lipid metabolism in primary human monocyte-derived macrophages. *Metabolism* 2003;52:652-657.
18. Fu Y, Luo N, Lopes-Virella M F. Oxidized LDL induces the expression of ALBP/aP2 ARNm and protein in human THP-1 macrophages. *J Lipid Res* 2000;41:2017-2023.
19. Sun L, Nicholson AC, Hajjar DP, et al. Adipogenic differentiating agents regulate expression of fatty acid binding protein and CD36 in the J744 macrophage cell line. *J Lipid Res* 2003;44:1877-1886.
20. Makowski L, Boord JB, Maeda K, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:699-705.
21. Fidge N. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J Lipid Res* 1999;40:187-201.
22. Chiu DS, Oram JF, LeBoeuf RC et al. High-density lipoprotein-binding protein (HBP)/vigilin is expressed in human atherosclerotic lesions and colocalizes with apolipoprotein E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;-2350.
23. Zhang W-Y, Gaynor PM, Kruth HS. Apolipoprotein E produced by human monocyte-derived macrophages mediates cholesterol efflux that occurs in the absence of added cholesterol acceptors. *J Biol Chem* 1996;271:28641-28646.
24. Bellosta S, Mahley RW, Sanan DA, Murata J, Newland DL, Taylor JM, Pitas RE. Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice. *J Clin Invest* 1995;96:2170-2179.
25. Mazzone T, Basheeruddin K. Dissociated regulation of macrophage LDL receptor and apolipoprotein E gene expression by sterol. *J Lipid Res* 1991;32:507- 514.
26. Castilho LN, Chamberland A, Boulet L, et al. Effect of atorvastatin on ApoE and ApoC-I synthesis and secretion by THP-1 macrophages. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42:251-257.
27. O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, et al. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1994;145:883-894.
28. Lijnen HR. Plasmin and Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling. *Thromb Haemost* 2001;86:324-333.
29. Winberg JO, Kolset SO, Berg E, Uhlin-Hansen L. Macrophages secrete matrix metalloproteinase 9 covalently linked to the core protein of chondroitin sulphate proteoglycans. *J Mol Biol* 2000;304:669-680.
30. Death AK, Fisher EJ, McGrath KCY, et al. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 2003;168:263-269.

EFECTO ANTICOMPLEMENTARIO DE LA BILIRRUBINA



Columnista Experto de SIIC
Dr. Aldo D. Mottino

Profesor Asociado Area Fisiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Investigador principal, Instituto de Fisiología Experimental, CONICET. Fisiopatología-Gastroenterología-Metabolismo y transporte de xenobióticos.

Antecedentes

El sistema del complemento (C) es una de las vías principales por las que el reconocimiento del antígeno se convierte en una defensa efectiva contra la infección, lo que es particularmente importante en la protección contra bacterias extracelulares.¹ Este sistema está formado por un gran número de diferentes proteínas plasmáticas, la mayoría de las cuales circulan como cimógenos que se activan en forma secuencial a través de una cascada de reacciones enzimáticas. Una de las vías más comunes de activación del C es la vía clásica, la cual se inicia por la unión de complejos antígeno-anticuerpo al componente C1 del C. Tanto la participación exagerada como disminuida del sistema del C puede llevar a enfermedad. Comprender el mecanismo de modulación de la actividad de este sistema podría contribuir a contrarrestar alteraciones patológicas de su función. En los últimos años nos hemos dedicado a estudiar el efecto modulador *in vitro* de la bilirrubina sobre la activación del C, particularmente por la vía clásica, y sus consecuencias *in vivo* en animales de experimentación.

En los vertebrados, el grupo hemo de la hemoglobina se degrada primariamente a los pigmentos biliares biliverdina (BV) y bilirrubina (BR), aunque pueden existir vías alternativas de degradación y también puede ser excretado en bilis sin cambios.² La BV representa un intermediario importante en

la síntesis de BR, su conversión en BR es mediada por un proceso de reducción, muy eficiente en mamíferos. Como resultado, la mayor parte de los pigmentos biliares excretados en bilis están representados por BR, particularmente en forma de conjugados con ácido glucurónico. Es interesante destacar que la BR en la bilis se reconvierte rápidamente a BV por oxidación espontánea, si la BV es derivada fuera del organismo.

Estudios recientes indican que la BV es capaz de inhibir la activación del C por la vía clásica.³ Esto puede explicar la utilidad del uso de la bilis de buey, rica en BV, como medicamento antialérgico por parte la medicina tradicional china. Sin embargo, el hecho de que BV se convierta rápidamente en BR una vez incorporada exógenamente a los mamíferos,⁴ sugiere que su efecto anticomplementario podría estar mediado esencialmente por la BR. De ser así, surge entonces un interrogante: ¿podría el sistema del C estar alterado en humanos en situaciones de ictericia?

Para evaluar esta posibilidad, en una primera etapa realizamos estudios *in vitro* comparando la acción inhibitoria de la BR y la BV sobre la activación del C de origen humano por la vía clásica. Los resultados, publicados en 1999,⁵ indicaron que el efecto inhibitorio de la BR (a) fue mayor que el de la BV, (b) se localizó sobre el componente C1 de la cascada del C, (c) involucró la etapa de unión entre el anticuerpo (tanto IgM como IgG) y el subcomponente C1q del C1 y, (d) fue mayor para la BR no conjugada que para su derivado conjugado con ácido glucurónico. Todos estos efectos fueron dependientes de la dosis y se manifestaron a concentraciones de BR superiores a las fisiológicas, específicamente por encima de 34 μM (2 mg/dl). Estos resultados confirmaron nuestra hipótesis sobre el efecto inhibitorio de la BR sobre el sistema del C. Claramente, el efecto podría tener alguna implicancia en el organismo intacto, aunque fundamentalmente en situaciones de ictericia con aumento de BR no conjugada.

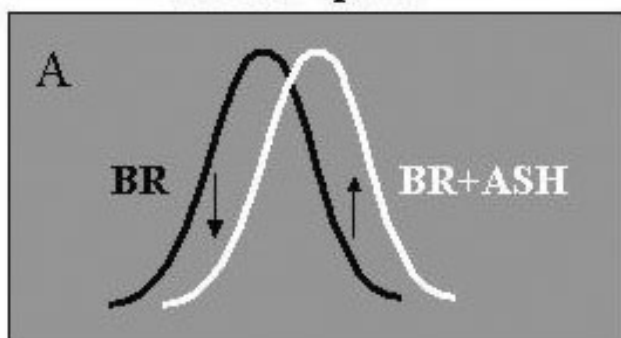
En una segunda etapa, y para verificar que la BR no conjugada era capaz de inhibir la activación del C *in vivo*, desarrollamos un protocolo experimental en la rata. Dicho protocolo permitió evaluar la activación intravascular del C por la vía clásica, a través de la detección de la hemoglobina liberada por lisis de eritrocitos de carnero transfundidos a ratas Wistar portadoras de anticuerpos heterófilos. Los resultados, publicados en 2002,⁶ mostraron que la BR no conjugada fue capaz de atenuar la activación del C, su efecto fue dependiente de la dosis y, como era de esperar, sólo visible en concentraciones superiores a las fisiológicas.

En función de los primeros estudios que mostraron que la BR interfiere la unión de IgM o IgG a C1q, surgió el interés de probar si el pigmento podría unirse directamente a C1q, en el sitio (o próximo al sitio) de unión de las inmunoglobulinas, compitiendo así con IgM o IgG por la unión a C1q. En la etapa más reciente de nuestro estudio analizamos la interacción de la BR con C1q mediante la técnica de espectrofotometría diferencial. Los resultados se presentan a continuación en forma sintética.

Interacción de BR con C1q

La BR es un pigmento amarillo que presenta un espectro de absorción específico con un pico máximo a aproximadamente 450 nm. Desde hace años se sabe que al interactuar con ciertas proteínas, el pico del espectro de la BR puede cambiar de posición. Este cambio, específicamente estudiado para la interacción con albúmina sérica, se debe a una transformación estructural en la molécula del pigmento que conlleva a cambios en sus propiedades fisicoquímicas, incluido el espectro de absorción. Técnicamente, el procedimiento consiste en evaluar el espectro de absorción del pigmento, antes y después de agregar la proteína de unión en concentraciones crecientes. El resultado se visualiza como la resta de los espectros con proteína y sin proteína, tal como se muestra en la figura 1 para la albúmina sérica humana (ASH). Así, el corrimiento del pico de absorción de la BR en presencia de ASH hacia la derecha (Fig. 1A) se traduce, al realizar el espectro diferencial, en una curva de valores negativos y luego positivos conforme aumenta el valor de longitud de onda (Fig. 1B). Un corrimiento en el espectro de absorción de la BR en presencia de C1q confirmaría nuestra presunción acerca de una interacción específica entre ambos.

Densidad óptica



Cambios de densidad óptica

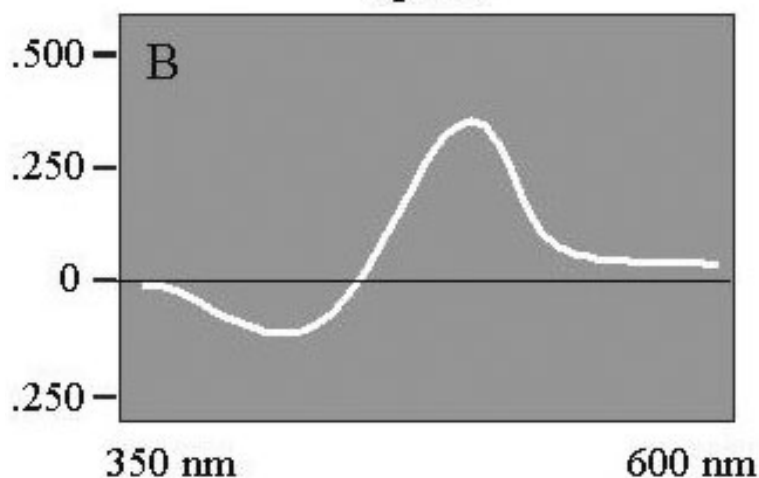


Figura 1. Construcción del espectro diferencial de bilirrubina. El panel A muestra el desplazamiento del espectro de absorción de bilirrubina (BR) hacia longitudes de onda mayores en presencia de albúmina sérica humana (ASH). Al restar de este último el primero se obtiene el espectro diferencial (panel B), indicativo de interacción específica entre el ligando (BR) y la proteína (ASH). El mismo se registra como cambios de densidad óptica en función de los cambios de longitud de onda.

El análisis del espectro de absorción de la BR en presencia de C1q se realizó a 25°C en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 S, doble haz. La BR se disolvió en un volumen mínimo de NaOH 0.1 N y se diluyó en solución de Mayer conteniendo concentraciones apropiadas de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Para las mediciones de absorbancia diferencial, el mismo volumen de la solución de BR fue pipeteado en dos cubetas diferentes. Luego se agregaron volúmenes crecientes de una solución de C1q de origen comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EE.UU.) o de solución de buffer Tris 0.150 M, NaCl 1.5 M; pH 7.3 (solvente de C1q), en la cubeta para muestra y en la de referencia, respectivamente. Como controles positivos y negativos se analizaron los espectros de absorción diferenciales de la BR en presencia de ASH o IgG humana respectivamente, ya que en experimentos preliminares observamos que la IgG no interacciona con la BR.

Los resultados se muestran en la Fig. 2. Se observa que C1q es capaz de unirse a la BR, al modificar su espectro de absorción y confirmar una interacción específica, no presente para el control negativo IgG. Se desprende de los mismos resultados que las concentraciones de C1q (margen derecho de la figura) necesarias para producir el desplazamiento del espectro fueron menores que las de ASH necesarias para producir un desplazamiento de magnitud similar. Esto sugiere mayor afinidad de la BR por C1q que por ASH. Esta observación podría explicar por qué el pigmento fue capaz de inhibir la activación del C en animales *in vivo*, aun cuando, como es sabido, las concentraciones fisiológicas de albúmina sérica son muy superiores a las de C1q.

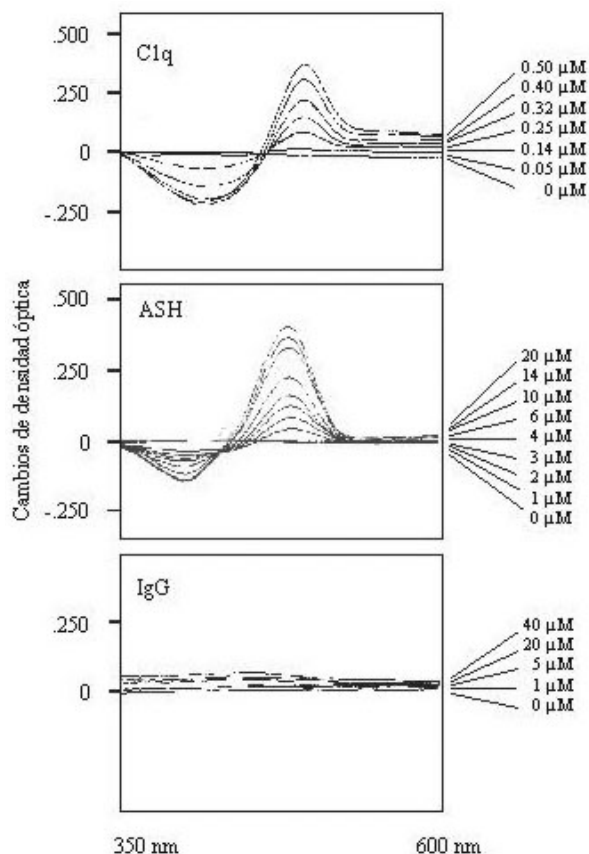


Figura 2. Espectro diferencial de bilirrubina en presencia de C1q. Se muestra el espectro diferencial de bilirrubina (BR) ante el agregado de concentraciones crecientes de C1q (margen derecho) y de los controles positivo (albúmina sérica humana, ASH) y negativo (inmunoglobulina G humana, IgG). El estudio demuestra interacción entre C1q y BR, aunque con un perfil cualitativamente y cuantitativamente diferente del de la interacción ASH-BR. Como era de esperar, IgG no modificó el espectro de absorción de BR, lo que indica ausencia de interacción entre ambas.

Se ha demostrado que la BR se une a grupos amino de lisina presentes en la ASH a través de interacciones electrostáticas del tipo dipolo-dipolo. Se sabe además que C1q es una de las proteínas más básicas del organismo debido a su elevado contenido en arginina e hidroxilisina. Nuestro modelo para explicar los hallazgos observados hasta el presente se muestra en la Fig. 3 y plantea que la BR, en particular en su forma no conjugada y a concentración superior a la fisiológica, se une a C1q en algún sitio de su cabeza globular (crítico para la unión de inmunoglobulinas), muy probablemente a través de uniones dipolo-dipolo, inhibiendo así el inicio de la activación de C1 y, por ende, la activación de la vía clásica del C. La interacción normal entre las cabezas globulares de C1q y la región Fc de las inmunoglobulinas (panel A), en el ejemplo de la Fig. 3, unidas a antígenos de superficie, no puede producirse si se une BR a C1q (panel B).

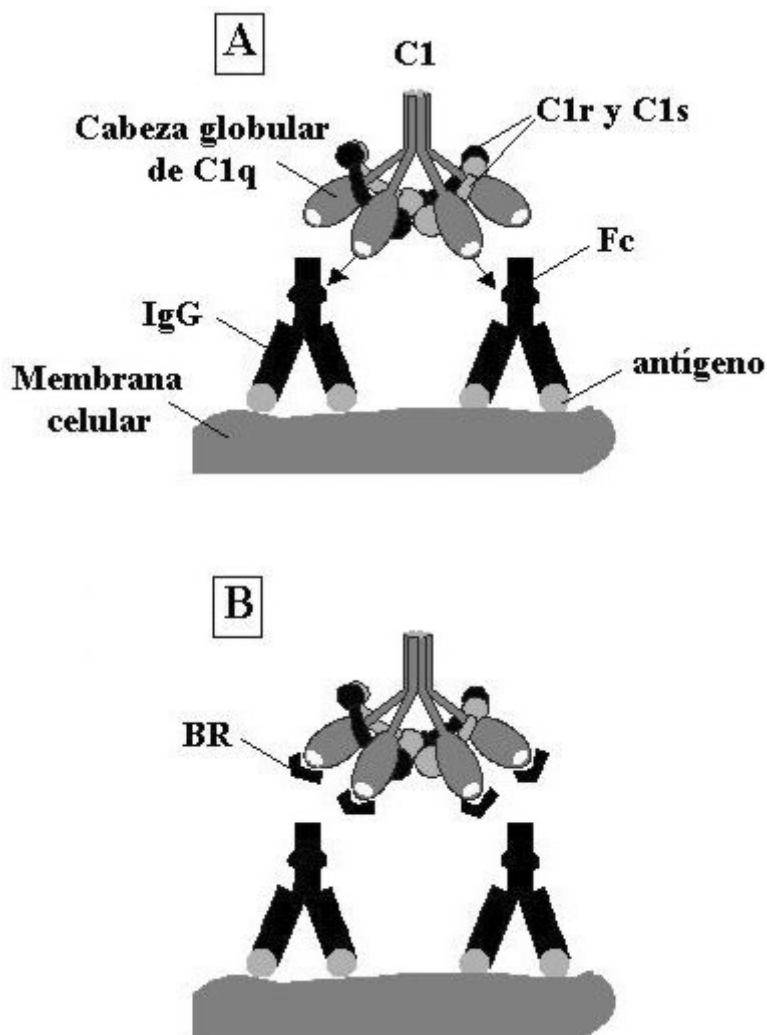


Figura 3. Probable mecanismo inhibitorio de la bilirrubina sobre la activación del complemento. La activación del complemento por la vía clásica se inicia con la unión de las cabezas globulares de C1q a las regiones Fc de las inmunoglobulinas que forman parte de los complejos antígeno-anticuerpo, en este caso fijados a la superficie de la membrana celular (Panel A). La flecha negra indica el sitio de esa unión. La presencia de bilirrubina (BR) en concentraciones suprafiológicas bloquea esa posibilidad de unión, al interactuar con las cabezas globulares de C1q, posiblemente generando un impedimento estérico (panel B).

Perspectivas e incertidumbres

Las propiedades anticomplementarias de la BR podrían atenuar la lesión celular mediada por C en patologías tales como las anemias hemolíticas autoinmunes,⁷ la hepatitis B aguda^{8,9} o el rechazo hiperagudo de un trasplante hepático ABO incompatible.¹⁰ En contrapartida, si se considera la participación del C en la defensa contra bacterias y virus, la hiperbilirrubinemia podría contribuir a incrementar la susceptibilidad a infecciones, especialmente en situaciones donde la síntesis hepática es deficiente, tales como en las enfermedades hepáticas crónicas¹¹ o en el recién nacido.¹² Todas las alteraciones mencionadas cursan con niveles elevados de BR (fundamentalmente en su forma no conjugada) y por ello las proponemos como ejemplos posibles de inhibición de la actividad del C por exceso de pigmento. Nuestros estudios siempre han sido básicos y desafortunadamente, hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio poblacional en pacientes que permita confirmar nuestras presunciones.

Por su propia naturaleza, nuestros estudios en cambio podrían contribuir al conocimiento de los mecanismos que modulan negativamente la acción del C, y con ello al mejoramiento de estrategias terapéuticas para mitigar los efectos inflamatorios en enfermedades que cursan con activación del C. Por ejemplo, es de destacar que algunos medicamentos actúan atenuando los síntomas en enfermedades que cursan con un componente inflamatorio, a través de su acción anticomplementaria. Al ejemplo de la bilis de buey antes mencionado debe agregarse el del extracto de raíz de *Glycyrrhiza glabra* (regaliz). Sus propiedades antiinflamatorias y antialérgicas se atribuyen

a uno de sus principales componentes, el ácido β -glicirretínico. En un estudio reciente, Kroes y col. (1997) demostraron que este componente, de estructura esteroidea, posee la capacidad de inhibir la activación del C por la vía clásica. Esta propiedad resultó estrictamente dependiente de la estructura conformacional del compuesto, ya que el isómero alfa no mostró propiedades anticomplementarias. Posteriormente, un estudio mecanístico reveló que el ácido β -glicirretínico actúa a través de sus propiedades moduladoras sobre el componente C2 del sistema del C.¹³ Por otra parte, la inhibición terapéutica de la cascada del C a nivel de C5 con anticuerpos específicos puede impedir la formación del potente péptido anafilotóxico y quimiotáctico C5a atenuando las reacciones inflamatorias mediadas por C.¹⁴ Al respecto, en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico se demostró que la terapia con anti-C5 monoclonal resultaba en una disminución significativa de la progresión de la glomerulonefritis lúpica y en un marcado aumento de la sobrevivencia de los animales.¹⁵ Finalmente, teniendo en cuenta que la actividad anti-C5 es retenida por el fragmento variable del anticuerpo, surge la posibilidad de diseñar pequeñas moléculas de características análogas a estas secuencias peptídicas con actividad antiinflamatoria.¹⁶ Así, el estudio de la modulación de las propiedades inflamatorias del C representa un campo atractivo y poco explorado aun para el tratamiento de diversas enfermedades. Nuestra contribución en particular abre una expectativa sobre la posibilidad de explotar la interacción de moléculas pequeñas con la subunidad C1q, punto clave en el disparo de la activación del C por la vía clásica. La estructura de la BR puede ser un marco de referencia inicial.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su gratitud a los Dres. Guillermo Picó, José M. Pellegrino, Bibiana Nerli y Diana Romanini por su generosa colaboración. Los estudios informados en el artículo fueron realizados con el apoyo de Universidad Nacional de Rosario, CONICET, ANPCyT y Fundación Antorchas, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tomlinson S. Complement defense mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5: 83-89.
2. Tenhunen R, Marver H, Schmidt R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: Stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J. Lab. Clin. Med.* 1970; 75: 410-421.
3. Nakagami T, Toyomura K, Kinoshita T y col. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: Anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993; 1158: 189-193.
4. Mora M, Bari S, Awruch J. In vivo studies of hepatobiliary excretion of bilirubins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997; 7: 1249-1254.
5. Arriaga S, Mottino A, Almará A. Inhibitory effect of bilirubin on complement-mediated hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1473: 329-336.
6. Arriaga S, Almará A, Mottino A. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 64: 741-744.
7. Agarwal B. Autoimmune hemolytic anemia. *Indian J. Pediatr.* 1998; 65: 663-668.
8. Trepo C, Robert D, Motin J y col. Hepatitis B antigen (HBsAg) and/or antibodies (anti-HBs and anti-HBc) in fulminant hepatitis: pathogenic and prognostic significance. *Gut.* 1976; 17: 10-13.
9. Ikeda T, Kurebayashi Y. A rat model of acute liver necrosis induced by a monoclonal antibody to liver-specific antigen and complement. *Hepatology.* 1991; 13: 1152-1157.
10. Demetris A, Jaffe R, Tzakis A y col. Antibody-mediated rejection of human orthotopic liver allografts. A study of liver transplantation across ABO blood group barriers. *Am. J. Pathol.* 1988; 132: 489-502.
11. Kourilsky O, Leroy C, Peltier A. Complement and liver cell function in 53 patients with liver disease. *Am. J. Med.* 1973; 55: 783-790.
12. Drew J, Arroyave C. The complement system of the newborn infant. *Biol. Neonate.* 1980; 37: 209-217.
13. Kroes B, Beukelman C, Van Den Berg A y col. Inhibition of human complement by β -glycyrrhetic acid. *Immunology.* 1997; 90: 115-120.
14. Muller-Eberhard H. Molecular organization and function of the complement system. *Annu. Rev. Biochem.* 1988; 57: 321-357.
15. Wang Y, Rollins S, Madri J y col. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 8955-8992.
16. Matis L, Rollins S. Complement-specific antibodies: Designing novel anti-inflammatories. *Nat. Med.* 1995; 1: 839-842.