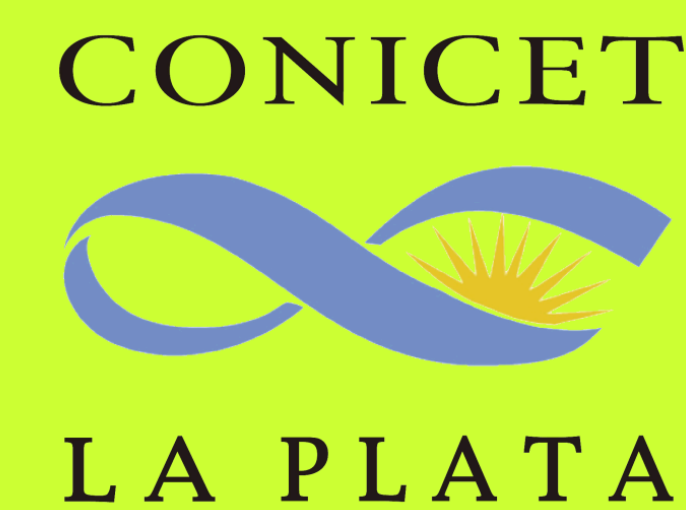




CORTISOL COMO INHIBIDOR DE LA ENTRADA DE LDL-Ox Y DE LA REMOCIÓN DE COLESTEROL EN MACRÓFAGOS THP1.



¹Toledo J; ^{2,3}Ledda A; ^{2,3}Esteve M; ^{2,3}Grassa M; ¹Díaz Ludovico I; ^{2,3}Gulfo J; ¹Garda H
¹Gonzalez Marina C

¹INIBIOLP-CONICET, Facultad Cs. Médicas, UNLP, 60 y 120, La Plata. e-mail: marinacego@med.unlp.edu.ar

²Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona (España)

³CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, ISCIII, (España)

Introducción

La arteriosclerosis es una patología que conlleva un estado inflamatorio subyacente el cual influye en la progresión de la enfermedad. La patología involucra la síntesis de un gran número de citoquinas pro y anti-inflamatorias. El desarrollo de la placa arteriosclerótica comienza con el reclutamiento e infiltración de monocitos circulantes en áreas de deposición lipídica con daño físico donde se diferencian a macrófagos "foams cells" o células "espumosas" al endocitar lipoproteínas alteradas como las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-Ox) que han sido internalizadas en la pared arterial. De esta manera, los macrófagos adquieren un fenotipo M1 (pro-inflamatorio) y M2 (anti-inflamatorio) dependiendo del estímulo hormonal y lipídico circundante.

El cortisol es un glucocorticoide con acción anti-inflamatoria que actúa en la resolución de la inflamación mediante, entre otras acciones, la activación de la población de macrófagos anti-inflamatoria de tipo M2c, inhibición de citoquinas pro-inflamatorias e inhibición de receptores específicos de LDL-Ox (*Toll like receptor type 4*).

Si bien la mayor parte de los glucocorticoides son sintetizados en las glándulas suprarrenales, a nivel de tejidos periféricos, entre ellos las células del sistema inmune, la señal glucocorticoide puede verse amplificada o inhibida por la actividad de las enzimas 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11 β HSD1) y de tipo 2 (11 β HSD2) respectivamente:

Por otro lado, la prevalencia de foams cells es dependiente de la remoción lipídica hacia aceptores específicos como lo son la apolipoproteína A-I, la cual es el componente proteico principal de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)

El OBJETIVO del presente trabajo fue comparar el efecto del cortisol y cortisona sobre la expresión de genes relacionados al metabolismo del colesterol en relación a la entrada, almacenamiento y remoción del mismo en macrófagos humanos. El estudio fue realizado con macrófagos de la línea THP1 tratados con LDL-Ox para posibilitar la formación de foams cells.

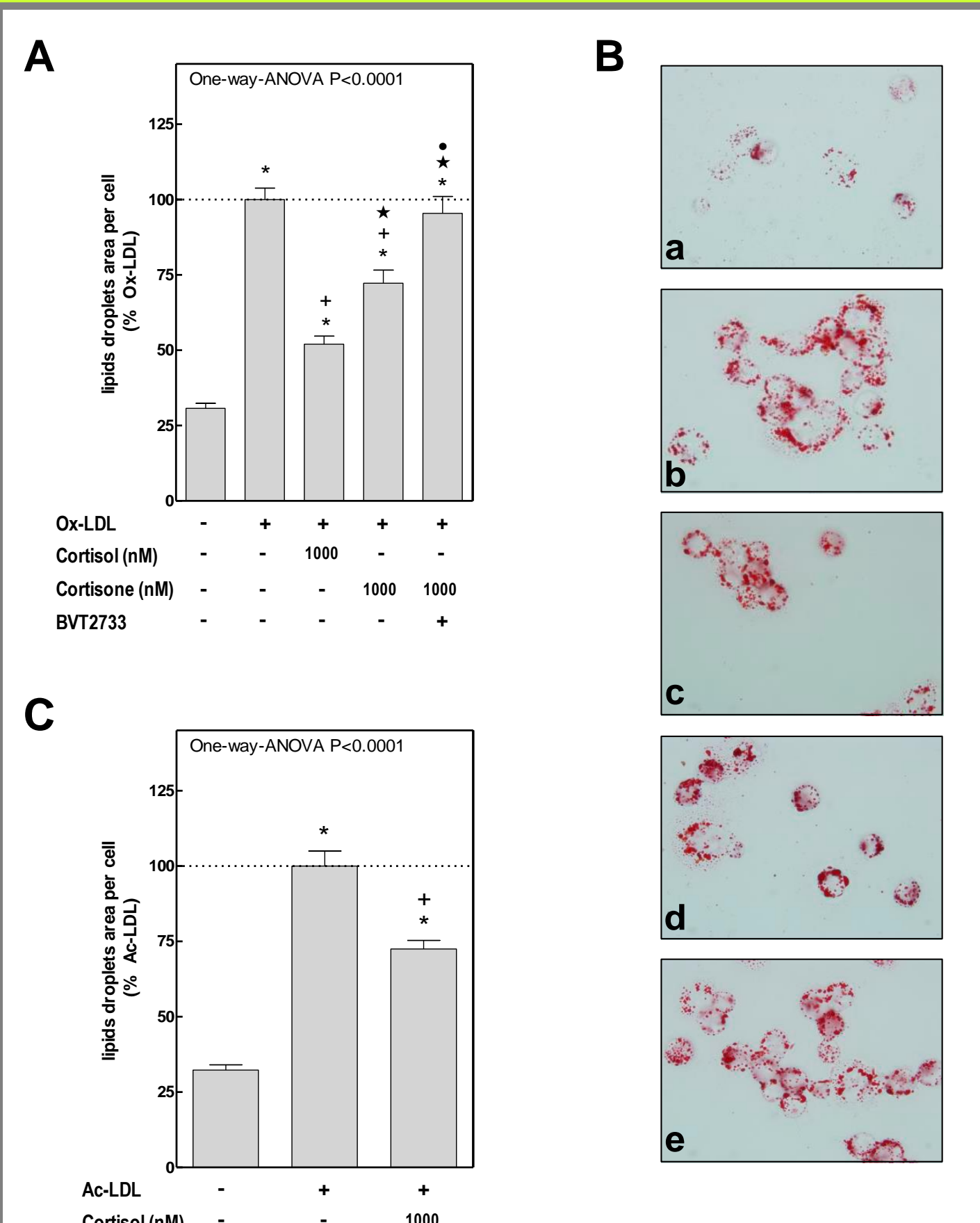


Figura 3. Se cuantificaron las gotas de lípidos intracelulares por tinción con oil-red en macrófagos THP1. A) Gotas lipídicas en THP1 incubados sin LDL-Ox, con LDL-Ox y con LDL-Ox mas cortisol, cortisona o cortisona mas BVT2733. B) Imágenes representativas de células THP1 teñidas con oil-red (100 X). a) THP1 cultivadas sin LDL-Ox, b) THP1 cultivadas con LDL-Ox, c) THP1 cultivadas con LDL-Ox mas cortisol, d) THP1 cultivadas con LDL-Ox mas cortisona. e) THP1 cultivadas con LDL-Ox mas cortisona y BVT2733. C) Gotas lipídicas en THP1 incubados sin LDL-Ox, con LDL-Ox y con LDL-Ox mas Ac-LDL. En todos los casos cortisol y cortisona se utilizaron a 1000 nM. La significancia por ANOVA y test de Bonferroni se incluyeron en el gráfico. * p < 0.05 vs sin LDL-Ox o LDL-Ox; + p < 0.05 con LDL-Ox o LDL-Ox; + vs LDL mas cortisol + p < 0.05 vs LDL-Ox mas cortisona

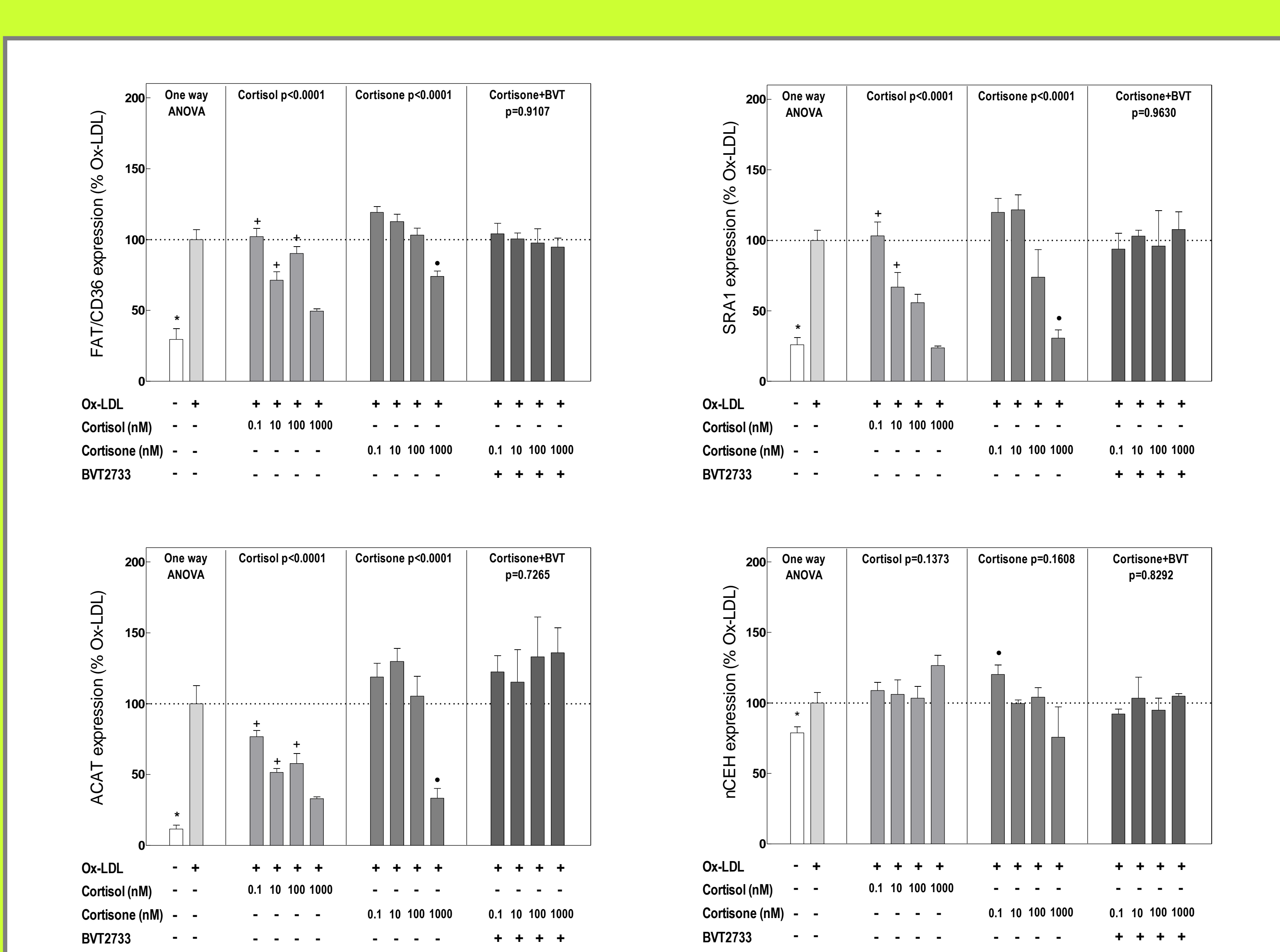


Figura 1. Expresión de genes involucrados en el ingreso del colesterol y su esterificación e hidrólisis como ésteres de colesterol en células THP1 tratadas con LDL-Ox o LDL-Ox mas cortisol, cortisona o cortisona con BVT2733. Los datos son expresados como porcentaje de la expresión medida en células incubadas con LDL-Ox. Se evaluaron translocasa de ácidos grasos (FATCD36), receptor scavenger clase A tipo1 (SRA 1), acil-coA colesterol aciltransferasa (ACAT) y colesterol esterasa neutra (nCEH). La significancia calculada por ANOVA para cada grupo de tratamiento hormonal se muestra en el gráfico. Se utilizó test de student para las comparaciones * sin LDL-Ox vs con LDL-Ox; + Cortisol vs Cortisone; * Cortisone vs Cortisone con BVT2733. Valores de P < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos

Materiales y Métodos

Células: Los experimentos fueron realizados con monocitos humanos (THP1). Las células fueron crecidas en medio de cultivo RPMI con 10%SFB. Los monocitos fueron estimulados con ésteres de forbol (PMA- 10 ng/ml) durante 24 hs para promover la conversión de los mismos en macrófagos.

Preparación de LDLs oxidadas (LDL-Ox) y LDLs acetiladas (LDL-ac):

LDLs nativas fueron peroxidadas con Cu²⁺ (5 μ M) durante 8 hs para la obtención de LDL-Ox. La preparación final fue caracterizada para determinar su grado de peroxidación empleando diferentes técnicas: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y carbonilos proteicos (PCs). Las LDLs-ac se obtuvieron a partir del agregado de acetato de sodio y anhídrido acético según la metodología descrita por Fraenkel-Conrat con algunas modificaciones.

Viabilidad celular: macrófagos THP1 luego de alcanzar su crecimiento hasta semiconfluencia fueron tratados con 100 μ g/ml LDL-Ox + diferentes concentraciones de cortisol (0.1, 10, 100, 1000 nM), cortisona o cortisona/BVT2733 (un específico inhibidor de 11 β HSD1) por 24 hs. El porcentaje de viabilidad fue determinado por la técnica de exclusión de tripan blue y en todos los casos fue superior al 85%.

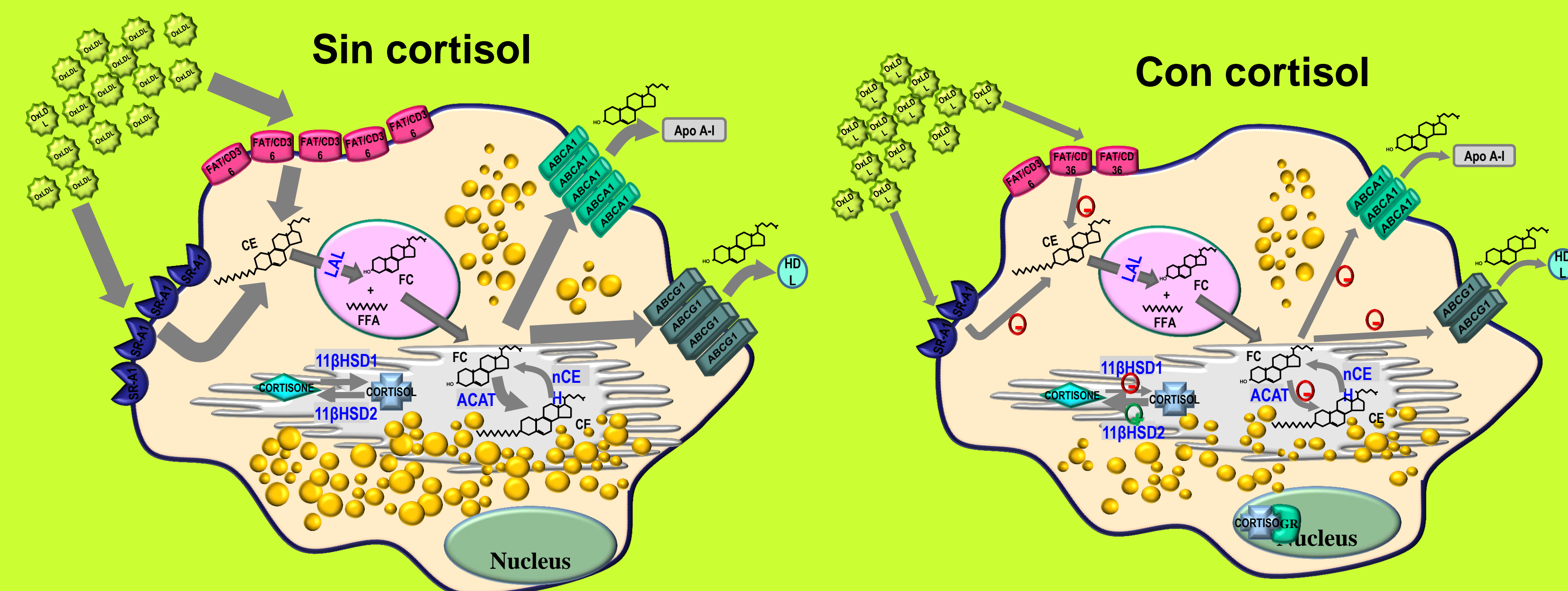
Cuantificación de la expresión génica por real-time PCR (RT-PCR): macrófagos THP1 fueron tratados con LDL-Ox (100 μ g/ml) + diferentes concentraciones de cortisol, cortisona y cortisona/BVT2733 durante 24 hs (0.1, 10, 100, 1000 nM):

Genes seleccionados que median la entrada de las LDL-Ox: FAT/CD36 (ácido graso translocasa) y SRA1 (receptor scavenger de tipo A1).

Genes involucrados en la esterificación y desesterificación intracelular del colesterol: ACAT (acilCoA colesterol aciltransferasa) y nCEH (hidrolasas neutras de ésteres de colesterol).

Genes que median el eflujo o remoción del colesterol: LXR α (receptor X hepático), ABC-A1 y ABC-G1 (ATP binding cassette tipo A1 y G1), ApoE (apolipoproteína E).

Cuantificación de "lipids droplets" o gotículas lipídicas como indicadores de "foams cells" mediante la técnica de oil red: La técnica convencional de oil red fue utilizada para cuantificar el área de las gotículas lipídicas. Se realizó la comparación del efecto de LDL-Ox y LDL acetiladas (LDL ac) en la formación de lipids droplets por estímulo de glucocorticoides. El programa utilizado fue Image J.



Resultados

Genes que median la entrada de las LDL-Ox en células THP1

LDL-Ox promueven la expresión de genes involucrados en la incorporación de las mismas en las células como lo son los receptores FAT/CD36 y SRA1. La incubación de las células con cortisol hace disminuir la expresión de ambos receptores (Fig. 1).

Genes involucrados en la esterificación y desesterificación del colesterol en células THP1

LDL-Ox promueven la expresión de ACAT1, enzima encargada de esterificar al colesterol y almacenarlo en gotículas lipídicas. El tratamiento con cortisol hace disminuir su expresión (Fig. 1). La hidrolasa de ésteres de colesterol (nCEH), enzima encargada de desesterificar al colesterol, aumentó su expresión génica en células cargadas con LDL-Ox, sin embargo, el cortisol no indujo cambios en los niveles de expresión (Fig. 1).

Genes involucrados en la remoción o eflujo del colesterol en células THP1

LDL-Ox promueven la expresión de receptores involucrados en la remoción del colesterol como ABCA1 y ABCG1, la del factor de transcripción LXR α (inductor de la expresión de ABCA1 y ABCG1) y la de apolipoproteína E (apoE). El cortisol hace disminuir en todos los casos su expresión (Fig. 2).

Efecto de la cortisona sobre el proceso de inflamación y el metabolismo del colesterol:

El efecto de la cortisona sobre la expresión génica fue más atenuado que el cortisol. A altas dosis de tratamiento con cortisona los efectos generales que se observan mimetizan la respuesta del tratamiento con cortisol. Sin embargo la presencia de un inhibidor (BVT2733) que impide la conversión de cortisona en cortisol hace que dicha respuesta observada por efecto de la cortisona sea indicativa de que no es la cortisona la responsable de la disminución de la expresión génica observada sino del cortisol que se está sintetizando naturalmente a partir de la cortisona en los macrófagos.

Genes que median la conversión de cortisona en cortisol y viceversa:

En relación a la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo de los glucocorticoides, se ha observado un aumento en la expresión de 11 β HSD2 y una disminución de 11 β HSD1 por tratamiento con cortisol de manera dosis dependiente. El tratamiento con cortisona no afecta la expresión de 11 β HSD2.

Cuantificación de lipids droplets:

Las gotículas lipídicas fueron incrementadas 2.4 veces por efecto de las LDL-Ox, sin embargo, en los tratamientos con cortisol y cortisona el área representada por las gotículas lipídicas fue menor, registrando un aumento de 1.9 veces. La presencia de glucocorticoides causó una tendencia a disminuir en un 20% la acumulación lipídica inducida por LDL-Ox. La presencia de BVT2733 bloqueó el efecto de la cortisona dando un similar resultado al observado en tratamientos realizados únicamente con LDL-Ox. (Fig. 3).

CONCLUSIONES

LDL-Ox activa la expresión de genes involucrados en la entrada de las mismas y en la esterificación y remoción del colesterol; sin embargo, el cortisol promueve el efecto contrario. En concordancia con la inhibición de la expresión génica de la entrada y remoción del colesterol por tratamiento con cortisol observamos una disminución de las gotículas lipídicas celulares por lo que concluimos que el cortisol tiene un efecto directo antiaterogénico favoreciendo la disminución de las foams cells.

La adición de BVT2733, un inhibidor de la actividad de 11 β HSD1, previene la conversión de cortisona en cortisol, lo cual evidencia que solo el cortisol contribuye tanto a la respuesta antiinflamatoria como así también a la inhibición de la formación de las células espumosas.

