

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

Efecto del tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno sobre la actividad y expresión del receptor de LDL en linfocitos primarios humanos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR

Francisca Cerrato Fernández

Directores

Diego Gómez-Coronado Cáceres
Miguel Ángel Lasunción Ripa

Madrid, 2015

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DEL TAMOXIFENO, RALOXIFENO
Y TOREMIFENO SOBRE LA ACTIVIDAD Y
EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LDL EN
LINFOCITOS PRIMARIOS HUMANOS**

FRANCISCA CERRATO FERNÁNDEZ

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**EFEECTO DEL TAMOXIFENO, RALOXIFENO
Y TOREMIFENO SOBRE LA ACTIVIDAD Y
EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LDL EN
LINFOCITOS PRIMARIOS HUMANOS**

Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor en Biología
presentada por

Francisca Cerrato Fernández

VºBº del director de Tesis:

VºBº del director de Tesis:

Dr. Diego Gómez-Coronado Cáceres
Adjunto del Servicio de Bioquímica-
Investigación del Hospital Universitario
Ramón y Cajal de Madrid.

Dr. Miguel Ángel Lasunción Ripa
Jefe del Servicio de Bioquímica-
Investigación del Hospital Universitario
Ramón y Cajal de Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**EFEECTO DEL TAMOXIFENO, RALOXIFENO
Y TOREMIFENO SOBRE LA ACTIVIDAD Y
EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LDL EN
LINFOCITOS PRIMARIOS HUMANOS**

Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor en Biología
presentada por

Francisca Cerrato Fernández

VºBº del tutor de Tesis.

Dr. Manuel Guzmán Pastor

Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad
Complutense de Madrid

A Aurelio, a mi familia, a mi amiga y a mis compañeros

“Incompleta fuera la actividad del científico si se contrajera exclusivamente a actuar sobre las cosas, opera también sobre las almas. Ello es deber primordial si el investigador pertenece al magisterio. Todos tienen el derecho de esperar que buena parte de la labor del maestro sea empleada en forjar discípulos que le sucedan y le superen. El cumplimiento de tal capital función constituye la más noble ejecutoria del investigador y el más preeminente título a la gratitud de sus hermanos de raza”.

*Santiago Ramón y Cajal
(1852-1934)*

Quiero reconocer y agradecer a todas las personas que durante estos años me han acompañado, ayudado y han hecho posible este trabajo de investigación con sus consejos y enseñanzas.

Al Dr. Diego Gómez-Coronado por su talento y talante por sus habilidades didácticas, por enseñarme todo lo que sé y lo que se me ha “olvidado”, por su rigor, perseverancia e incansable tesón.

Al Dr. Miguel Ángel Lasunción por ser el “maestro”, por su GENEROSIDAD tanto profesional como personal.

A Toñi por su humanidad y sus risas.

A Mila mi “colegui” modelo de trabajo fino

A Rebeca por su colaboración y preocupación

A mis “chicas de oro” Merche, Maribel, Gely, Lidia, Maica, Ana, Ascen, Feli, Angelines..... por esos “buenos ratos” dentro y fuera del laboratorio.

A las chicas del “array” y alrededores Lorena, Vero, MariEmi, M^a Eugenia Gema, Cova.... la juventud y la alegría.

A Javier por ser nuestra entrañable wikipedia.

A Luis por nuestras relajadas charlas de “pájaros, pajaritos y pajarracos”.

A Alberto C. por el cariño con que me ha tratado y ayudado y que yo he “guardado”.

A Isabel Candela que con su ayuda hemos conseguido hacer más “vistoso” este trabajo.

Al resto de compañeros de los Servicios de Investigación–Bioquímica y Neurobiología del Hospital Ramón y Cajal por su ayuda y amistad fraguada en los ratos compartidos en “cultivos”, “pasillos” y “desayunos”.

A los que no están en esta página y han compartido, en otro tiempo, trabajo y dedicación por la investigación.

Todos me habéis ofrecido lo mejor de vosotros y nunca me habéis negado nada, por ello este trabajo también es fruto de vuestro esfuerzo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
SUMMARY	VII
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. ATEROSCLEROSIS Y COLESTEROL	3
1.2. EL COLESTEROL	4
<i>1.2.1. Función</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2. Síntesis</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2.1. Regulación</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2.2. Inhibición farmacológica</i>	<i>10</i>
1. 3. LIPOPROTEÍNAS	11
<i>1.3.1. Clasificación y características de las lipoproteínas</i>	<i>11</i>
<i>1.3.2. Metabolismo de las lipoproteínas</i>	<i>14</i>
1.4. EL RECEPTOR DE LDL	16
<i>1.4.1. Función y ciclo biológico</i>	<i>16</i>
<i>1.4.2. Estructura</i>	<i>19</i>
<i>1.4.3. Mutaciones en el receptor de LDL</i>	<i>21</i>
<i>1.4.4. Regulación del receptor de LDL</i>	<i>22</i>
<i>1.4.4.1. Regulación por esteroides</i>	<i>22</i>
<i>1.4.4.2. Regulación independiente de esteroides.</i>	<i>26</i>
1. 5. HIPERCOLESTEROLEMIA	27
<i>1.5.1. Hipercolesterolemia familiar</i>	<i>28</i>
<i>1.5.2. Apo B defectuosa familiar</i>	<i>29</i>
<i>1.5.3. Hipercolesterolemia asociada a PCSK9</i>	<i>29</i>
<i>1.5.4. Hipercolesterolemia autosómica recesiva</i>	<i>30</i>
<i>1.5.5. Sitosterolemia</i>	<i>30</i>
<i>1.5.6. Deficiencia de colesterol 7α-hidroxilasa</i>	<i>31</i>
<i>1.5.7. Tratamiento de la hipercolesterolemia</i>	<i>31</i>
1.6. MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS	33
<i>1.6.1. Receptores de estrógenos</i>	<i>33</i>
<i>1.6.1.1. Estructura</i>	<i>33</i>

1.6.1.2. <i>Mecanismo de acción</i>	34
1.6.2. Características y acciones de los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos	36
1.6.2.1. <i>Mecanismo de acción dependiente de los receptores de estrógenos</i>	38
1.6.2.2. <i>Mecanismos de acción independientes de los receptores de estrógenos</i>	38
1.6.2.3 <i>Tamoxifeno</i>	39
1.6.2.4. <i>Raloxifeno</i>	42
1.6.2.5. <i>Toremifeno</i>	42
1.6.2.6 <i>Modulación del metabolismo lipídico por los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos</i>	43
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1. MATERIALES	51
3.2. MÉTODOS	52
3.2.1. <i>Pacientes</i>	52
3.2.2. <i>Aislamiento y cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica</i>	53
3.2.3. <i>Cultivo de las líneas celulares</i>	53
3.2.4. <i>Aislamiento y marcaje de LDL</i>	53
3.2.5. <i>Ensayos de la actividad del receptor de LDL</i>	54
3.2.6. <i>Determinación de la B_{max} de unión y captación de LDL por los linfocitos</i>	55
3.2.7. <i>Análisis del contenido y biosíntesis de colesterol</i>	56
3.2.8. <i>Determinación de la incorporación de [3H]oleato a los ésteres de colesterol</i>	57
3.2.9. <i>Electroforesis e inmunodetección (western blot)</i>	57
3.2.10. <i>Tinción de las células con filipina y microscopía de fluorescencia</i>	58
3.2.11. <i>Tinción de las células con May-Grünwald Giemsa y microscopía óptica</i>	58
3.2.12. <i>Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR</i>	58
3.2.13. <i>Análisis estadístico</i>	60
4. RESULTADOS	63
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS SERM SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE LDL EN LINFOCITOS HUMANOS	63

<i>4.1.1. Efecto de la dosis y el tiempo de tratamiento con los SERM sobre la actividad del receptor de LDL</i>	63
<i>4.1.2. Efecto de los SERM sobre la expresión del receptor de LDL</i>	65
<i>4.1.3. Efecto de los SERM sobre el contenido celular y la biosíntesis de colesterol</i>	67
<i>4.1.4. Efecto de los SERM sobre la distribución intracelular del colesterol libre</i>	69
<i>4.1.5. Efecto de los SERM en la vía de SREBP y actividad de ACAT</i>	74
<i>4.1.6. Análisis del efecto de la combinación de los SERM con la lovastatina sobre la actividad del receptor de LDL. Comparación con las células MOLT-4 y HepG2</i>	77
<i>4.1.7. Efectos de ICI 182,780 y 17β-estradiol sobre la actividad del receptor de LDL</i>	80
<i>4.1.8. Efecto del endoxifeno sobre la actividad del receptor de LDL</i>	82
4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS SERM SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE LDL EN LINFOCITOS DE PACIENTES CON HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR	83
<i>4.2.1. Determinación de las B_{max} de unión y captación del receptor de LDL</i>	84
<i>4.2.2. Efecto de los SERM sobre la actividad del receptor de LDL</i>	84
<i>4.2.3. Análisis del efecto de la combinación de los SERM con la lovastatina sobre la actividad del receptor de LDL</i>	87
5. DISCUSIÓN	91
6. CONCLUSIONES	103
7. BIBLIOGRAFÍA	107
PUBLICACIONES	123

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABC	caja de unión de ATP (<i>ATP-binding cassette</i>)
ABCG1	transportador G1 de la caja de unión de ATP (<i>ATP-binding cassette transporter G1</i>)
ACAT-1	acil-CoA colesterol: acil transferasa (<i>acyl-CoA cholesterol acyl-transferase</i>)
AEBS	sitio de unión de antiestrógenos (<i>antiestrogen binding site</i>)
ANOVA	análisis de la varianza
Apo	apolipoproteína
ARH	proteína de la hipercolesterolemia autosómica recesiva (<i>autosomal recessive hypercholesterolemia protein</i>)
ASO	oligonucleótidos antisentido
ATP	adenosina trifosfato
CETP	proteína transferidora de ésteres de colesterol
CHILD	hemidisplasia congénita con nevo ictiosiforme y defectos en las extremidades (<i>congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects</i>)
DBD	dominio de unión a ADN (<i>DNA binding domain</i>)
DiI	fluorocromo lipofílico
DMAPP	3,3-dimetilalil pirofosfato
E2	17 β -estradiol
ECH	epoxicolesterol hidroxilasa
EGF	factor de crecimiento epidérmico
END	endoxifeno
ER	receptores de estrógenos
ERE	elemento de respuesta a estrógenos
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares (<i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
FDB	defecto familiar de apo B
FF-MAS	esterol activador de la meiosis del fluido folicular (<i>follicular-fluid meiosis-activating sterol</i>)
FH	hipercolesterolemia familiar
FPP	farnesil pirofosfato

GPER	receptores estrogénicos de membrana acoplados a proteínas G
HDL	lipoproteínas de alta densidad (<i>high density lipoprotein</i>)
HeFH	hipercolesterolemia familiar heterocigota
HepG2	hepatocitos humanos
HMG-CoA	3 β -hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HoFH	hipercolesterolemia familiar homocigota
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IDL	lipoproteínas de densidad intermedia (<i>intermediate density lipoprotein</i>)
INSIG	gen inducido por insulina (<i>insulin induced gene</i>)
IPP	isopentenil 3-pirofosfato
LBD	dominio de unión al ligando (<i>ligand binding domain</i>)
LCAT	lecitina-colesterol aciltransferasa
LDL	lipoproteína de baja densidad (<i>low density lipoprotein</i>)
LOV	lovastatina
LPDS	suero deficiente en lipoproteínas
LPL	lipoproteína lipasa
LRP	proteína relacionada con el receptor de LDL
LXR	receptor X hepático (<i>liver X receptor</i>)
M.I.F	mediana de la intensidad de fluorescencia
MED-PED	<i>Make Early Diagnosis to Prevent Early Death</i>
MOLT-4	linfocitos T procedentes de leucemia linfoblástica aguda humana
MR	medidas repetidas
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MTP	proteína microsomal transferidora de triglicéridos
NL	normolipémico
NPC1	Niemann-Pick tipo C1
NPC2	Niemann-Pick tipo C2
PBMC	célula mononuclear de sangre periférica
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCSK9	convertasa de la proproteína subtilisina kexina tipo 9 (<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>)
RAL	raloxifeno
rLDL	receptor de lipoproteínas de baja densidad
ROS	especies reactivas de oxígeno

SBF	suero bovino fetal
SCAP	proteína activadora de la escisión de SREBP (<i>SREBP cleavage-activating protein</i>)
SERM	moduladores selectivos de los receptores de estrógenos
SIRE	elemento regulador independiente de esteroides (<i>sterol-independent regulatory element</i>).
siRNA	RNA pequeño de interferencia
SR	receptor basurero o <i>scavenger</i>
SRE	elemento regulado por esteroides (<i>sterol regulatory element</i>)
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SSD	dominio sensible a esteroides (<i>sterol-sensing domain</i>)
TAM	tamoxifeno
T-MAS	esterol activador de la meiosis testicular (<i>testicular meiosis-activating sterol</i>)
TOR	toremifeno
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad (<i>very low density lipoprotein</i>)

SUMMARY

SUMMARY

Effect of tamoxifen, raloxifene and toremifene on LDL receptor activity and expression in primary human lymphocytes

The low-density-lipoprotein (LDL) receptor (LDLR) is a 160-kDa cell surface glycoprotein that binds and mediates internalization of LDL and very low-density lipoprotein remnants. LDLR activity is a critical determinant of plasma cholesterol levels. Thus, mutations in the LDLR gene cause familial hypercholesterolemia (FH), the most common and severe form of monogenic hypercholesterolemia, with an autosomal codominant pattern of inheritance, and which highly increases the risk for cardiovascular disease. LDLR-bound lipoproteins are transported to acidic endocytic compartments where cholesteryl esters, the major component of LDL, are hydrolyzed to free cholesterol by lysosomal acid lipase. The subsequent egress of cholesterol from the endosomal compartment allows cholesterol to be available to other intracellular organelles. The cholesterol that reaches the endoplasmic reticulum can be reesterified by acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) for storage in cytoplasmic lipid droplets.

Cells maintain their cholesterol content within a narrow range, LDLR-mediated cholesterol uptake and endogenous cholesterol biosynthesis being subject to negative feedback regulation by intracellular cholesterol. The cholesterol-sensing machinery, including the sterol regulatory element binding protein (SREBP), resides in the endoplasmic reticulum. When cells are depleted of cholesterol, SREBP is transported to the Golgi apparatus, where the active form of SREBP is produced. This activates the transcription of the LDLR and cholesterol biosynthetic genes. When cholesterol levels rise, SREBP is retained in the endoplasmic reticulum, thus preventing its activation and gene induction. This regulatory mechanism is essential for the action of statins, which are competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis. By inhibiting this pathway, statins induce a compensatory increase of the expression of LDLR, effectively lowering LDL-cholesterol levels.

Selective estrogen receptor modulators (SERMs) are nonsteroidal molecules that bind to estrogen receptors (ER) and which are widely prescribed for the treatment and prevention of breast cancer, osteoporosis and ovulatory dysfunction. SERMs display an

estrogen-agonist or estrogen-antagonist effect depending on the tissue targeted. Additionally, ER-independent effects have been reported. Tamoxifen (TAM) and toremifene (TOR), respectively a first and a second generation SERM derived from triphenylethylene, are used to treat breast cancer. Raloxifene (RAL) is a benzothiophene derivative indicated for the treatment and prevention of osteoporosis in postmenopausal women.

Treatment with SERMs consistently decreases plasma and LDL-cholesterol levels. The mechanism for this effect has not been fully established, but both the inhibition of cholesterol biosynthesis and the increase of LDLR activity may be involved. Our group has shown that TAM increases LDLR expression and activity in the MOLT-4 cell line, in which TAM interfered with the egress of LDL-derived cholesterol from the late endosomal/lysosomal compartment, thus preventing the LDL-induced down-regulation of LDLR expression. Moreover, when TAM and lovastatin (LOV) were combined the stimulation of LDLR activity was synergistic. Cell lines are proliferating cells that require a high provision of cholesterol for membrane biosynthesis. In the present study we assessed the effect of clinically used SERMs in non-proliferating primary human cells.

In the present study, we aimed the following objectives:

1. To determine the effect of TAM, RAL and TOR on LDLR activity in primary human lymphocytes and to compare this effect with that produced in MOLT-4 lymphoblasts and HepG2 hepatocytes.
2. To determine the effect of the combination of the SERMs with LOV on LDLR activity.
3. To ascertain the mechanisms involved in the effect of SERMs on LDLR activity, including the potential involvement of estrogen receptors.
4. To ascertain the effectiveness of the SERMs in LDLR defective lymphocytes from familial hypercholesterolemic subjects.

Lymphocytes were isolated from peripheral blood, treated with the different compounds and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindocarbocyanineperchlorate (DiI)-labeled LDL uptake was analyzed by flow cytometry.

TAM, RAL and TOR increased DiI-LDL uptake in a dose- and time-dependent manner, TAM being the most active, followed by TOR, whereas RAL had no appreciable effect below a 5 μ M dose. When the amount of active LDLR was determined, it was found that treatment with any of the SERMs opposed the LDL-mediated repression; TAM and RAL were the most and least effective, respectively, in opposing the LDL effect. In complete agreement with the latter results, the three SERMs abrogated the LDL-mediated reduction of LDLR protein levels, as analysed by western blot, TAM and RAL being, again, the most and least effective, respectively. Addition of vitamin E only slightly prevented the stimulation of the expression of active LDLR by SERMs, suggesting that the effect of these drugs is not mediated by reactive oxygen species.

The cholesterol content of lymphocytes was moderately increased by the SERMs, although this increase was not statistically significant. Cholesterol biosynthesis from [14 C]acetate when primary lymphocytes were incubated with LPDS, which maximally stimulates such a pathway, was scarce as compared with that in MOLT-4 cells, suggesting that the inhibition of cholesterol biosynthesis did not significantly contribute to the increased LDLR expression by SERMs.

The effect of the SERMs on cellular cholesterol distribution was analyzed by filipin staining and fluorescence microscopy. Treatment with any SERM in the presence of DiI-LDL caused the accumulation of cytoplasmic granules of free cholesterol, which co-localized with DiI fluorescence, thus indicating that LDL-derived cholesterol is retained in late endosomes/lysosomes.

The increased expression of LDLR in association with an accumulation of LDL-derived cholesterol in late endosomes/lysosomes prompted us to measure the expression of SREBP-2 and SREBP-1-target genes. The SERMs opposed the LDL-mediated repression of the expression of *LDLR*, *HMGCR*, *FASN* and *SREBF2*. Consistently, the SERMs prevented the reduction of nuclear SREBP-2 levels induced by LDL. For comparison, we measured the expression of *ABCA1*, an LXR-target gene, and found that the three SERMs greatly attenuated the stimulation of *ABCA1* expression by LDL. Moreover, we found that these drugs diminished the incorporation of [3 H]oleic acid into cholesteryl esters by ACAT. As a whole, these observations are consistent with an impairment of LDL-derived cholesterol trafficking in lymphocytes by the SERMs.

Next, we studied the effect of the combined treatment with the SERMs and lovastatin on LDLR activity. In MOLT-4 and HepG2 cells, the three SERMs significantly stimulated DiI-LDL uptake, whereas lovastatin alone was ineffective, this being attributable to the counter-regulatory effect of LDL. However, when lovastatin was combined with the different SERMs a significantly greater DiI-LDL uptake was observed in each case relative to the corresponding SERM alone. As regards primary lymphocytes, lovastatin alone did not alter DiI-LDL uptake. In these cells the synergistic effect with lovastatin was milder than in those cell lines, and only when the SERM concentration was increased to 10 μ M a significant effect was observed with the three SERMs.

To discern the involvement of ERs in the effect of SERMs on LDLR activity, lymphocytes were treated with the different SERMs or 17 β -estradiol (E2) in the absence or the presence of ICI 182,780, a selective ER downregulator. ICI 182,780 did not alter the stimulatory effect of any SERM on DiI-LDL uptake by lymphocytes. Consistently, E2 was unable to appreciably influence DiI-LDL uptake as compared with untreated cells, and ICI 182,780 addition also produced no effect. Additionally, when E2 was combined with the SERMs, it did not alter the effect of any of these drugs.

We explored whether endoxifen (END), considered the most important active metabolite of TAM, stimulates, like TAM, or not, like E2, lymphocyte LDLR activity. END dose-dependently increased DiI-LDL uptake so that at a 5 μ M concentration its effect equalled that of TAM at the same dose. Moreover, the effect of END was not inhibited by ICI 182,780.

The effects of the SERMs on LDLR activity in lymphocytes from clinically diagnosed FH patients were assessed. Since as found herein sex had no influence on the effect of the SERMs on LDLR activity, individuals of both sexes were analyzed together. On average, lymphocytes from FH subjects had significantly lower B_{\max} values for DiI-LDL binding and uptake than those from normolipidemic (NL) subjects. In FH lymphocytes, TAM and TOR augmented DiI-LDL uptake, both drugs displaying a similar potency, and RAL caused a milder increase. We could verify that a subset of 17 clinically diagnosed FH patients were actually heterozygous carriers of LDLR mutations (HeFH). When only HeFH subjects were analyzed, the effect of the SERMs remained. On the other hand, when the effect of each SERM relative to untreated lymphocytes was compared between NL and HeFH subjects, it was found that the

degree of stimulation of DiI-LDL uptake by TAM, TOR and RAL was similar in both groups of subjects. Additionally, three homozygous FH subjects (HoFH) with residual DiI-LDL uptake were studied. In HoFH lymphocytes, none of the SERMs exhibited an appreciable effect on DiI-LDL uptake.

Finally, we assessed the effect of the combinations of the SERMs with lovastatin on DiI-LDL uptake by the lymphocytes from 13 HeFH patients. In these cells, lovastatin alone was unable to increase DiI-LDL uptake and, differently to what occurred with lymphocytes from NL subjects, it did not display a synergistic effect with any of the SERMs added at a 5 μ M concentration.

It is concluded that TAM, TOR and RAL, in this order, stimulate LDLR activity and expression in primary human lymphocytes by interfering with the egress of LDL-derived cholesterol from late endosomes/lysosomes. This prevents the cholesterol-mediated repression of SREBP-2 processing and, thereby, *LDLR* expression. The effect of these SERMs on LDLR activity is ER-independent, but is preserved in the TAM active metabolite END, which suggests that the effect of the SERMs lie in the chemical properties conferred by their cationic amphiphilic structure. The combination of lovastatin with each of the three SERMs shows a synergistic effect on LDLR activity, although this effect is milder in primary lymphocytes than in HepG2 and MOLT-4 cells, likely due to the low cholesterol biosynthetic rates in the former cells. The magnitude of the effects of the SERMs on LDLR activity in FH lymphocytes with a partial deficiency of LDLR is similar to that in lymphocytes from NL subjects, but SERMs have no effect in HoFH lymphocytes, thus indicating that these drugs stimulate LDL uptake through the LDLR specifically. The mechanism of increase of LDLR activity described in this study may contribute to the LDL-cholesterol lowering action these SERMs have on patients.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ATEROSCLEROSIS Y COLESTEROL

Según la Organización Mundial de la Salud [1], la principal causa de muerte en el mundo, y especialmente en el industrializado, son las enfermedades cardiovasculares, repartidas estas entre las cardiopatías coronarias y los accidentes cerebrovasculares isquémicos, que tienen como causa común la aterosclerosis [2]. La aterosclerosis es un proceso de desarrollo lento y multifactorial que presenta como factores de riesgo la dislipemia, el tabaquismo, la hipertensión arterial y la diabetes, y con menor impacto el sedentarismo, la obesidad y el síndrome plurimetabólico.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de carácter fibroproliferativo que afecta a la íntima de la pared de las arterias. En dicha pared, la capa de células endoteliales puede ser dañada bien por factores químicos (hipercolesterolemia, tabaquismo, diabetes, agentes infecciosos...) o mecánicos (turbulencias del flujo sanguíneo). Estas agresiones dan lugar a la acumulación e interacción de elementos sanguíneos y componentes de la pared arterial, que da como resultado la formación de la lesión aterosclerótica. Este proceso puede comenzar con el daño endotelial, provocando cambios en la permeabilidad y, más adelante, en la adhesión celular en respuesta a varios factores estimuladores y de crecimiento, como M-CSF. Así, con la barrera endotelial dañada, se produce la infiltración principalmente de lipoproteínas de baja densidad (LDL) circulantes, ricas en colesterol, que en la íntima se oxidan y agregan, provocando una reacción inflamatoria que, mediante señales quimiotácticas y moléculas de adhesión, recluta monocitos que se adhieren a la pared endotelial y se infiltran hacia el interior de la pared arterial. Estos proliferan y se diferencian a macrófagos, los cuales captan las LDL oxidadas, principalmente mediante receptores *scavenger*, y acumulan grandes cantidades de colesterol esterificado en el citoplasma, por lo que a estas células se les denomina células espumosas, características ya en la estría grasa de las lesiones tempranas. Cuando se excede la capacidad de dichas células para acumular colesterol, éstas mueren y son fagocitadas por otros macrófagos o bien liberan su contenido al medio extracelular. El conjunto de macrófagos muertos, lípidos extracelulares y las células con restos de macrófagos y lípidos, se rodea de una capa de tejido conectivo derivado en parte de la migración y proliferación de células musculares lisas, formando así una placa de ateroma avanzada que puede reducir la luz

de la arteria. Si la capa fibrosa no mantiene una consistencia suficiente, puede producirse la ruptura de la placa hacia la luz del vaso, lo que desencadena la activación de varios factores de coagulación, produciéndose la trombosis vascular, responsable del evento cardiovascular agudo [3].

Independientemente de cual sea el factor principal que desencadene la aterosclerosis, es imprescindible la presencia de colesterol y, más frecuentemente, del ligado a las LDL, en las lesiones ateroscleróticas [4] De hecho, la concentración plasmática de colesterol es un importante factor de riesgo cardiovascular modificable para cuyo control eficaz se ha dedicado un gran esfuerzo. Así, se ha prestado especial atención al estudio y control de las dislipemias, de la hipercolesterolemia en particular, para su prevención y tratamiento, así como en hallar fármacos y mecanismos de acción alternativos.

1.2. EL COLESTEROL

Dada su función biológica y su implicación en procesos patogénicos, el colesterol es una molécula de gran relevancia en mamíferos y, particularmente, en la especie humana, motivo por el cual ha sido objeto de estudio desde distintas perspectivas.

1.2.1. Función

El colesterol es uno de los componentes principales de las membranas celulares de los organismos superiores, siendo especialmente abundante en la membrana plasmática, en la que modula sus propiedades de permeabilidad y fluidez. Así, la estructura plana e hidrofobicidad de la molécula de colesterol confiere a la membrana orden y cohesión con sus lípidos vecinos, reduciendo su fluidez y permeabilidad a moléculas polares. Además, este papel estructural le permite al colesterol regular la función de proteínas de membrana que participan en procesos de transducción de señales. Para ello, es relevante el hecho de que el colesterol presenta una distribución lateral heterogénea en la membrana plasmática, ya que se concentra, junto a diversas proteínas, en microdominios denominados balsas lipídicas [5].

Son bien conocidas las funciones metabólicas del colesterol como precursor de hormonas esteroídicas, así como de ácidos biliares, los cuales, aparte de ser esenciales para la absorción intestinal, constituyen una forma de excreción del propio colesterol.

Por otro lado, esta molécula está implicada en la embriogénesis, dada su unión covalente a las proteínas de la familia Hedgehog, que regulan la morfogénesis en el embrión, promoviendo la proliferación celular y evitando la apoptosis [6,7]. El colesterol también es clave para la sinaptogénesis, ya que participa en la formación y estabilización de las sinapsis y en la diferenciación neuronal [8,9]. Además, el colesterol tiene un importante papel en la proliferación celular regulando el ciclo celular, habiéndose demostrado en nuestro laboratorio que se requiere para la transición de G2 a mitosis y para la culminación de esta última fase [10,11]. Por último, cabe mencionar que el colesterol participa en la regulación de su propia homeostasis, lo que realiza principalmente mediante el control de la vía de los factores de transcripción SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) o bien previa conversión en determinados oxiesteroles, como los que activan al receptor nuclear LXR (*liver X receptor*) [12,13].

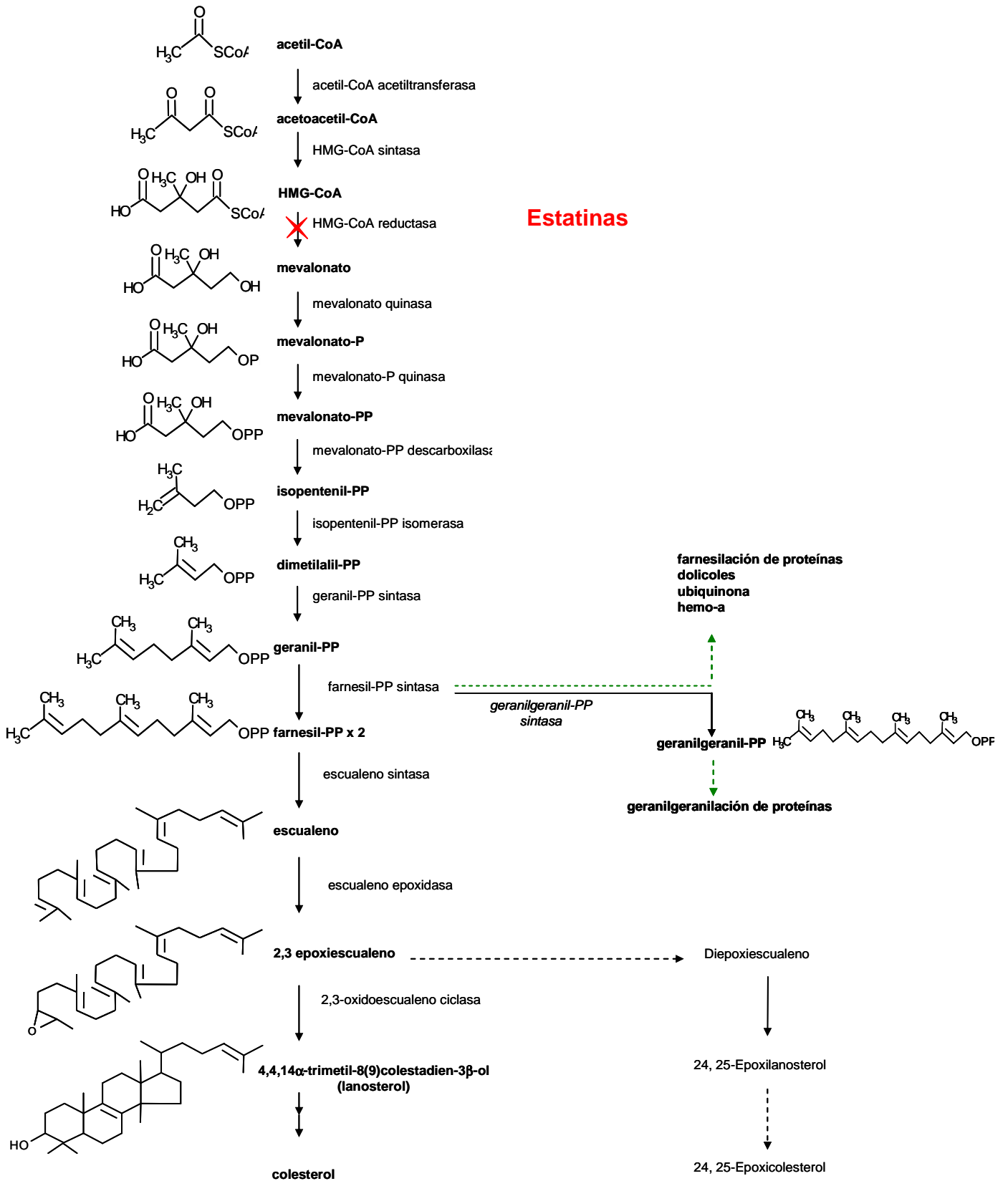
Las células animales obtienen colesterol a través de dos fuentes: mediante la síntesis de novo y mediante la captación del colesterol transportado por las lipoproteínas, destacando aquí la endocitosis de las LDL, principales transportadoras plasmáticas de colesterol en humanos, a través de su receptor específico, conocido como receptor de LDL (rLDL).

1.2.2. Síntesis

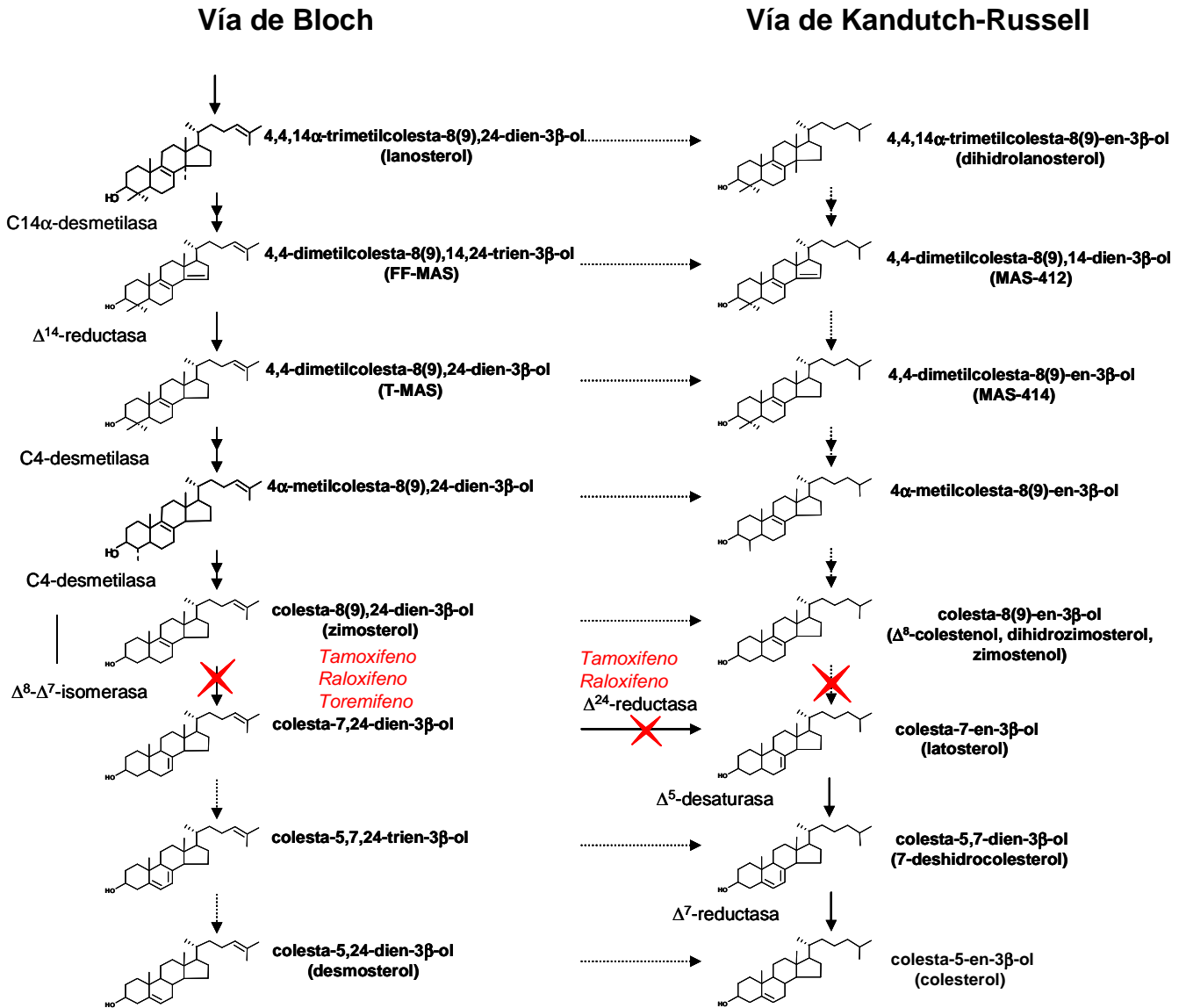
La síntesis de novo tiene lugar en el retículo endoplásmico, donde se localizan muchas de las enzimas implicadas [14,15], el citoplasma y los peroxisomas [16]. Este proceso (**esquema 1A,B**) se lleva a cabo en varias etapas, en las que además de colesterol, producto final, se sintetizan otros compuestos, de carácter esteroídico y no esteroídico, fundamentales para la célula [17].

En una primera etapa, la cual tiene lugar en el citoplasma, dos moléculas de acetil-CoA forman por condensación, acetoacetil-CoA; a ésta se le une una nueva molécula de acetil-CoA, con la participación de la 3 β -hidroxi-3-metilglutaril (HMG)-CoA sintasa, formándose HMG-CoA. Este compuesto, por acción de la HMG-CoA reductasa, forma mevalonato [18,19]. La HMG-CoA reductasa es la enzima limitante de la ruta y la cual se encuentra regulada mediante múltiples mecanismos. Además, es la diana de las estatinas, fármacos utilizados en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Mediante dos fosforilaciones sucesivas y, posteriormente, por acción de la mevalonato

difosfato descarboxilasa, el mevalonato es transformado en isopentenil pirofosfato (IPP), unidad básica para la síntesis de los isoprenoides. IPP se isomeriza a 3,3-dimetilalil pirofosfato (DMAPP). El IPP es precursor de la isopentenil adenina, que forma parte de algunos tRNA [20]. IPP y DMAPP sufren una condensación para dar geranyl pirofosfato, al que se le une otro IPP para dar farnesil pirofosfato (FPP). A partir de este último se originan, además de productos de naturaleza esteroídica, productos no esteroídicos, como los dolicoles y las ubiquinonas, que participan en la N-glicosilación de proteínas y en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, respectivamente, y el grupo hemo a, un componente de los complejos de la cadena respiratoria. Además, el FPP y un derivado suyo, el geranylgeranyl-PP, sirven de sustrato para la prenilación de proteínas, una modificación postraduccional que permite a éstas enclavarse en la membrana, donde llevan a cabo su función (proteínas de la familia Ras, Rho, laminas nucleares, etc.) [21,22]. La condensación de dos moléculas de FPP, da lugar al escualeno, y este, por ciclación, forma lanosterol, primer compuesto esteroídico de la ruta. La última etapa, de lanosterol a colesterol, puede llevarse a cabo a través de dos vías alternativas (**esquema 1B**), una denominada insaturada o vía de Bloch, en la que los esteroides presentan un doble enlace en la posición C24-25, o bien por la vía saturada o de Kandutsch-Russell, en la que dicho enlace se ha reducido. De manera resumida, las sucesivas reacciones que convierten el lanosterol en colesterol acarrear la pérdida de tres grupos metilo y la pérdida neta de un doble enlace (C24-25). En esta última etapa de la síntesis de colesterol se forman intermediarios con funciones de gran importancia, como FF-MAS (*follicular-fluid meiosis-activating sterol*) y T-MAS (*testicular meiosis-activating sterol*) que estimulan la meiosis [23,24], así como el 7-deshidrocolesterol, precursor de la vitamina D3. Una derivación de la ruta, la iniciada por la acción de la escualeno monooxigenasa sobre el 2,3-monoepoxiescualeno, da lugar a 24(S), 25-epoxilanoesterol, que por sucesivas reacciones acaba convirtiéndose en 24,25-epoxicolesterol, importante activador de LXR [25].



Esquema 1A. Ruta de biosíntesis de colesterol. Formación de derivados isoprenoides no esteroidicos. El aspa en rojo indica el paso de la ruta inhibido por las estatinas.



Esquema 1B. Ruta de biosíntesis de colesterol. Vía de Bloch y vía de Kandustch-Russel. Las aspas en rojo indican los pasos inhibidos por los SERM correspondientes.

La deficiencia en algunas de las enzimas de la ruta biosintética de colesterol produce enfermedades y malformaciones severas. Así, la aciduria mevalónica y las fiebres periódicas del tipo Dutch están causadas por la deficiencia en la mevalonato quinasa [26]. La displasia esquelética de Greenberg es debida a una deficiencia de la Δ^{14} -reductasa. El síndrome CHILD (*congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects*) está causado por la deficiencia de la esterol C-4 desmetilasa. El síndrome de Conradi-Hünemann-Happle está causado por deficiencia de la esterol Δ^8 -isomerasa. La latosterolosis es debida a la deficiencia de la Δ^5 -

desaturasa. El síndrome de Smith-Lemli-Opitz está causado por la deficiencia en la esterol Δ^7 -reductasa, que es la más frecuente de estas deficiencias. La desmosterolosis está causada por una deficiencia en la esterol Δ^{24} -reductasa. En general, estas deficiencias producen anomalías congénitas múltiples, como malformaciones, retraso mental y del desarrollo y alteraciones cutáneas y esqueléticas [27].

1.2.2.1. Regulación

La regulación se realiza principalmente mediante retroregulación por el producto final, que inhibe su síntesis, aunque este no es el único compuesto que ejerce dicho efecto. Si bien existen múltiples puntos de control [25], el principal punto de regulación de la ruta es el catalizado por la HMG-CoA reductasa [17,28]. La regulación de la HMG-CoA reductasa se da tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. El transcripcional es, junto con la degradación de la enzima, el principal mecanismo de regulación. Dicho mecanismo está mediado por los factores de transcripción SREBP [29], con especial mención de SREBP-2 y SREBP-1a, que se activan en respuesta a la disminución en el contenido celular de colesterol y se unen a los elementos regulados por esteroides (SRE, *sterol regulatory element*) localizados en el promotor de los genes que codifican para aquellas proteínas. Como resultado, la transcripción del gen se estimula. El colesterol y diversos oxisteroides, muchos de ellos derivados del colesterol, inhiben la activación de SREBP [30]. El mecanismo de regulación mediado por SREBP es común a la práctica totalidad de las enzimas de la síntesis de colesterol y al rLDL (ver más adelante 1.4.4. Regulación del receptor de LDL **esquema 3**). Otro mecanismo de regulación transcripcional de la HMG-CoA reductasa es el ajuste alternativo, mediante el cual se pueden generar transcritos más o menos productivos en función de la disponibilidad de esteroides [25].

En la regulación postranscripcional, el 25-hidroxicolesterol, derivado del colesterol, estimula la degradación del mRNA de la enzima, efecto que depende de la ausencia de mevalonato [31]. El 25-hidroxicolesterol, junto con derivados esteroídicos y no esteroídicos del mevalonato, también está implicado en la regulación negativa de la iniciación y la velocidad de la traducción [32]. Otro de los mecanismos postranscripcionales es mediante fosforilación y desfosforilación. Así, la HMG-CoA reductasa es fosforilada e inhibida, al igual que otras rutas biosintéticas, cuando el estado energético de la célula está comprometido [33]. También se ha demostrado que la ubiquitinación y posterior degradación de la proteína por el proteasoma es un

importante mecanismo de regulación de la HMG-CoA reductasa, el cual es estimulado por ciertos esteroides y derivados no esteroídicos del mevalonato. Este proceso está mediado por *Insig* (*insulin induced gene*), proteína integral del retículo endoplásmico, donde también se localiza dicha enzima. El lanosterol y, especialmente, el dihidrolanosterol estimulan la interacción de *Insig* con la HMG-CoA reductasa, conduciendo a la degradación por el proteasoma. Para ello, la enzima ubiquitinada debe salir del retículo endoplásmico, proceso que es estimulado por el geranylgeraniol [34].

1.2.2.2. Inhibición farmacológica

La inhibición farmacológica de la síntesis de colesterol puede tener lugar a distintos niveles y sobre distintas enzimas de la ruta, por compuestos tanto naturales como de síntesis. Cabe destacar a las estatinas, fármacos que se utilizan muy frecuentemente para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Son análogos estructurales del HMG-CoA y actúan como inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa. A las dosis terapéuticas inhiben la síntesis de mevalonato de forma parcial y, como consecuencia, también la de colesterol. Como resultado de la inhibición de la síntesis de colesterol, se estimula la expresión del rLDL, lo que aumenta la velocidad de captación de las LDL y reduce su concentración circulante [35].

La mevalonato difosfato descarboxilasa es inhibida por el fluoromevalonato y el fenilacetato [36,37]. La farnesil difosfato sintasa es inhibida por los bisfosfonatos nitrogenados [38], empleados en el tratamiento de la osteoporosis. La escualeno sintasa es inhibida por las escualestatinas, como el ácido zaragóxico [39].

La lanosterol 14 α -desmetilasa es inhibida por el SKF 104976, produciendo la acumulación de lanosterol y 24-dihidrolanosterol [10]. Dicha enzima también es inhibida por los antimicóticos miconazol y ketoconazol, debido a que estos inhiben las proteínas dependientes del citocromo P-450.

La esterol $\Delta^{8,7}$ -isomerasa es inhibida por el haloperidol, un antipsicótico con propiedades antagonistas de los receptores D2 de dopamina [40]. Por otro lado, las moléculas AY 9944 y BM 15766 son inhibidores no competitivos de la Δ^7 -reductasa [41]. Finalmente, la Δ^{24} -reductasa es inhibida por el triparanol, el U18666A [42] y el tamoxifeno, este último perteneciente a la clase de fármacos moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) y empleado en el tratamiento del cáncer de mama [43]. Además, nuestro grupo ha demostrado que los fitosteroides insaturados en C 22,

como el estigmasterol, el brasicasterol y el ergosterol, son inhibidores competitivos de la Δ^{24} -reductasa [44].

Es pertinente indicar que algunos de estos inhibidores y otros no citados, como sucede, por ejemplo, con diversos antipsicóticos [40] y SERM (ver más adelante), pueden inhibir, aunque con distinta afinidad, diversas enzimas de la biosíntesis de colesterol.

1. 3. LIPOPROTEÍNAS

La dificultad que presentan los lípidos para ser transportados a través del torrente sanguíneo, dado el carácter hidrofóbico de aquéllos, se resuelve con la asociación a moléculas proteicas específicas denominadas apolipoproteínas, formando así las lipoproteínas (ver [45]). Por tanto, éstas son complejos multimoleculares constituidos por una parte lipídica, que comprende moléculas de fosfolípidos, triglicéridos, colesterol esterificado y colesterol no esterificado, y por una parte proteica a base de apolipoproteínas, de las que se han descrito las siguientes: apolipoproteína (apo) A-I, A-II, A-IV, B-48, B-100, C-I, C-II, C-III, D, E (con tres isoformas: E-2, E-3 y E-4), F, G, H, J, L M y (a). Las lipoproteínas plasmáticas presentan una estructura cuasi esférica, con la disposición de los distintos componentes en función de su polaridad. En la parte externa, cubriendo toda la superficie, se entremezclan las apolipoproteínas con colesterol no esterificado y fosfolípidos, los cuales orientan sus grupos polares hacia el medio acuoso y sus regiones hidrofóbicas hacia el interior. Las apolipoproteínas poseen dominios hidrofóbicos, para la asociación íntima con los lípidos, y otros hidrofílicos, fundamentales para estabilizar la partícula, el tráfico y el metabolismo de los lípidos asociados [45]. En el interior de la partícula se encuentran los lípidos más apolares, como son los triglicéridos y el colesterol esterificado.

1.3.1. Clasificación y características de las lipoproteínas

Las lipoproteínas se clasifican en función de su densidad hidratada según se ha caracterizado mediante ultracentrifugación diferencial. Por ello, entre las distintas técnicas de separación y aislamiento de las lipoproteínas, la ultracentrifugación en sus diferentes modalidades (gradiente de densidad o secuencialmente en equilibrio de densidad), ha sido la principal técnica de elección. El peso específico o densidad viene en buena parte condicionada por el tamaño y la proporción de lípidos frente a proteínas.

Así, esta proporción va en sentido decreciente desde los quilomicrones a las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Es pertinente indicar que cada una de las fracciones lipoproteicas consta en realidad de una población de partículas heterogéneas y polidispersas en cuanto a sus características fisicoquímicas.

Aunque las diferentes lipoproteínas se distinguen por la naturaleza y la proporción de sus distintos lípidos y apolipoproteínas, en la circulación hay un continuo intercambio de muchos de estos componentes entre ellas.

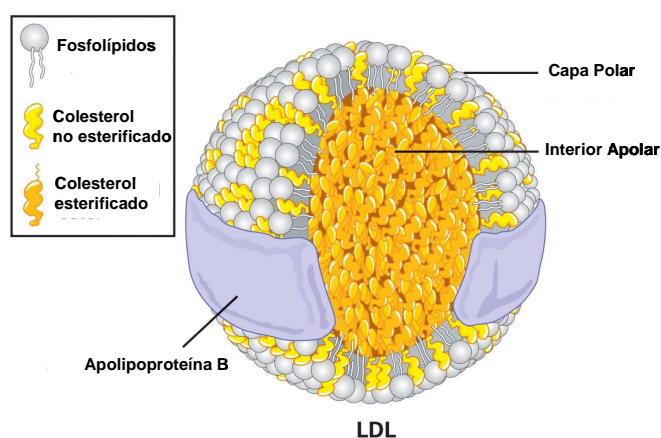
Los quilomicrones son las lipoproteínas de mayor tamaño y menor densidad ($d < 0.95$ kg/l). Se sintetizan en el intestino delgado a partir de los lípidos de la dieta, se liberan a la linfa mesentérica y finalmente al torrente sanguíneo. Contienen fundamentalmente triglicéridos (casi el 90 % de su masa) y pequeñas cantidades de colesterol, fosfolípidos, vitaminas liposolubles y apolipoproteínas. La principal apolipoproteína es la B-48 y, además, contienen apo A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E. Su función es transportar los ácidos grasos, el colesterol y las vitaminas liposolubles de la dieta a los diferentes tejidos. El tiempo de residencia en plasma es de 10 minutos, el máximo de su concentración en sangre se observa a las 2-4 h tras la ingesta y están prácticamente ausentes en el plasma postabsortivo.

Las VLDL, o lipoproteínas de muy baja densidad ($d < 1,006$ kg/l), se forman en el hígado a partir de los lípidos sintetizados endógenamente y los que proceden de la circulación. Están compuestas por triglicéridos como integrante mayoritario (55 %) y son relativamente pobres en colesterol libre y esterificado y fosfolípidos. Las apolipoproteínas que contienen son la B-100 (de la que se encuentra siempre una sola molécula, de ≈ 550 kDa, por partícula), principalmente, y apo C-I, C-II, C-III y E. Su función es el transporte de triglicéridos endógenos a los tejidos periféricos, principalmente el muscular y el adiposo. El tiempo de residencia en el plasma es de 2-4 h.

Las IDL, o lipoproteínas de densidad intermedia ($d = 1,006-1,019$ kg/l), contienen mayores proporciones de colesterol esterificado que las VLDL y presentan las apolipoproteínas B-100, C-III y E.

Las LDL, o lipoproteínas de baja densidad ($d = 1,019-1,063$ kg/l), son ricas en ésteres de colesterol (50 %) y contienen pocos triglicéridos. También contienen una molécula de apo B-100, que en este caso representa la práctica totalidad del contenido

proteico (21 %) (**esquema 2**). En humanos, dan cuenta de las dos terceras partes del colesterol del plasma. Su función es el transporte de colesterol a las células, y mayoritariamente al hígado. El tiempo de residencia en el plasma es de 2-3 días [4]. Se han identificado distintas subfracciones atendiendo a su densidad, denominándose LDL-I (grandes y livianas), LDL-II (de densidad intermedia), LDL-III (pequeñas y densas) y LDL-IV (pequeñas y muy densas) Las LDL-I y II se clasifican como de tipo A y las LDL-III de tipo B, según su movilidad electroforética [46].



Esquema 2. Estructura y principales componentes lipídicos de las LDL.

Las HDL, o lipoproteínas de alta densidad ($d=1,063-1,21$ kg/l), son las lipoproteínas más pequeñas y se sintetizan en el hígado, mayoritariamente, e intestino. Son ricas en proteína (50 %), que corresponde principalmente a apo A-I y, en menor medida, apo A-II. Los fosfolípidos, seguidos de los esteres de colesterol, son los componentes lipídicos predominantes y poseen un escaso contenido de triglicéridos. Su función principal en lo que a transporte lipídico se refiere es el transporte reverso del colesterol, desde los tejidos periféricos al hígado. El tiempo de residencia en el plasma es de 4-5 días.

Mediante la unión de la apo (a), sintetizada en el hígado, a la apo B-100 de las LDL se forma la Lp(a), cuya densidad ($1,05-1,11$ kg/l) se solapa con la correspondiente a LDL y HDL. No se conoce la función precisa de la Lp(a) [45].

1.3.2. Metabolismo de las lipoproteínas

Una vez que el intestino y el hígado secretan los quilomicrones y las VLDL, respectivamente, estas partículas intercambian distintos componentes con las otras lipoproteínas. Así, con las HDL intercambian apo C-II, apo E, colesterol libre y fosfolípidos, éstos últimos mediante la acción de la proteína transferidora de fosfolípidos. La lipoproteína lipasa (LPL), enzima anclada en el endotelio capilar, es la encargada de la hidrólisis de los triglicéridos de las lipoproteínas ricas en estos, quilomicrones y VLDL. La LPL es activada por la apo C-II de dichas partículas, liberando ácidos grasos, que son captados por los tejidos subyacentes [47]. Con la pérdida de los triglicéridos hay una reestructuración de los quilomicrones, transformándose en una partícula de menor tamaño denominada “remanente”, la cual, para mantener su estructura, también ha perdido fosfolípidos, colesterol libre y algunas apolipoproteínas A y C de su superficie. La partícula así formada, rica en esteres de colesterol y apo E, es captada, por el hígado principalmente, mediante el receptor de LDL (rLDL) y el receptor LRP para su posterior degradación. Por otro lado, los quilomicrones, por la acción de la proteína transferidora de esteres de colesterol (CETP, también denominada transportadora de lípidos neutros o LTP), reciben esteres de colesterol desde las HDL en intercambio por triglicéridos [48].

Dependiendo de la disponibilidad de triglicéridos, el hígado secreta dos tipos de VLDL: VLDL-1, de mayor tamaño y más ricas en triglicéridos, y VLDL-2, de menor tamaño y más pobres en triglicéridos. Las VLDL sufren en el plasma cambios semejantes a los que ocurren con los quilomicrones. La acción de la LPL hidroliza parte de los triglicéridos, propiciando la captación de ácidos grasos y glicerol por las células. Por acción de la CETP, reciben colesterol esterificado de las HDL a cambio de triglicéridos. Como consecuencia del catabolismo de las VLDL acaban formándose partículas de menor tamaño, las IDL, más ricas en colesterol y apo E, buena parte de las cuales son captadas por el hígado mediante el rLDL. Otras IDL sufren una lipólisis adicional por acción de la triglicérido lipasa hepática, que hidroliza también parte de sus fosfolípidos, reestructurándose la partícula y dando lugar a LDL, especialmente ricas en colesterol.

Las LDL, por tanto, provienen del catabolismo plasmático de las VLDL, teniendo a las IDL como intermediario de dicha conversión. En todo este proceso se conserva la molécula de apo B-100 incorporada a las VLDL en su síntesis. Las LDL son

captadas, para su posterior degradación, mayoritariamente por el hígado (75 %), y también por el intestino, las glándulas esteroideogénicas y multitud de tejidos a través del rLDL, el cual reconoce la apo B-100 (ver más adelante).

Las LDL que provienen de la deslipidación de las VLDL-1, de mayor tamaño, son las LDL-III (pequeñas y densas). Una elevación de la concentración de estas últimas se asocia con la enfermedad aterosclerótica. Penetran fácilmente en la pared arterial gracias a su pequeño tamaño y tienen una gran afinidad por los proteoglicanos contenidos en la misma, lo cual hace que se retengan más en el espacio subendotelial. Estas partículas tienen menor afinidad por el rLDL que las de tamaño grande y son más difíciles de retirar del plasma. Por último, carecen de vitamina E, lo que las hace más susceptibles a la oxidación. Los individuos que acumulan este tipo de partículas poseen un riesgo tres veces más alto de padecer infarto de miocardio [49].

Las LDL pueden ser modificadas por peroxidación lipídica, principalmente, y también por agregación, glicosilación, sialización, modificación enzimática, etc. Las LDL se oxidan y agregan cuando la partícula es retenida en el espacio subendotelial por los proteoglicanos de la matriz extracelular, evento implicado en la iniciación del proceso aterosclerótico. En esa localización las LDL son modificadas por diversas enzimas extracelulares, como lipoxigenasas, proteasas y lipasas. Las LDL así modificadas son reconocidas por receptores basureros o *scavenger*, presentes principalmente en los macrófagos. Son receptores de membrana que reconocen múltiples ligandos y no están regulados por colesterol y de los cuales se conocen varias familias. La familia A, a la que pertenecen SR-AI, SR-AII, SR-AIII y MARCO, reconocen a las lipoproteínas modificadas químicamente por peroxidación o acetilación. La familia B, de la que forman parte CD36, presentes en células monocíticas, y también en cerebro, tejido adiposo, endotelio, etc., y SR-BI o CLA-1 presentes en macrófagos, glándulas adrenales, ovarios y testículos. Reconocen LDL oxidadas, pero también pueden reconocer LDL nativas [50]. Otro importante receptor *scavenger*, perteneciente a la familia E, es LOX-1, al que se unen LDL oxidadas [51,52].

Las HDL, con la mediación de los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) A1 y G1 y de SR-BI, recogen el colesterol libre de las membranas celulares. Este proceso comienza con la transferencia de colesterol y fosfolípidos a la apo A-I o las pre- β -HDL mediante ABCA1. Este paso es crucial en la propia biosíntesis de las HDL, la cual tiene lugar principalmente en el hígado. El colesterol cedido a dichos aceptores se

esterifica por acción de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT). Estas HDL reciben más colesterol celular mediante ABCG1 y, especialmente en los macrófagos, SR-BI, con lo que la partícula crece en tamaño. En el plasma, los esteres de colesterol pueden ser transferidos a las lipoproteínas que contienen apo B, principalmente a las VLDL, por acción de la CETP, o bien ser captados selectivamente por el hígado o las glándulas suprarrenales mediante el receptor *scavenger* CLA-1/SR-BI. La partícula resultante, más pequeña, puede captar más colesterol en los tejidos periféricos. En el hígado, las HDL también puede ser captadas mediante la cooperación entre la F₁-ATP sintasa ectópica y P2Y₁₃ para su posterior degradación [53]. Como etapa final en el transporte reverso de colesterol, el hígado excreta esta molécula tal cual o previa conversión en ácidos biliares para formar parte de la bilis [54].

1.4. EL RECEPTOR DE LDL

1.4.1. Función y ciclo biológico

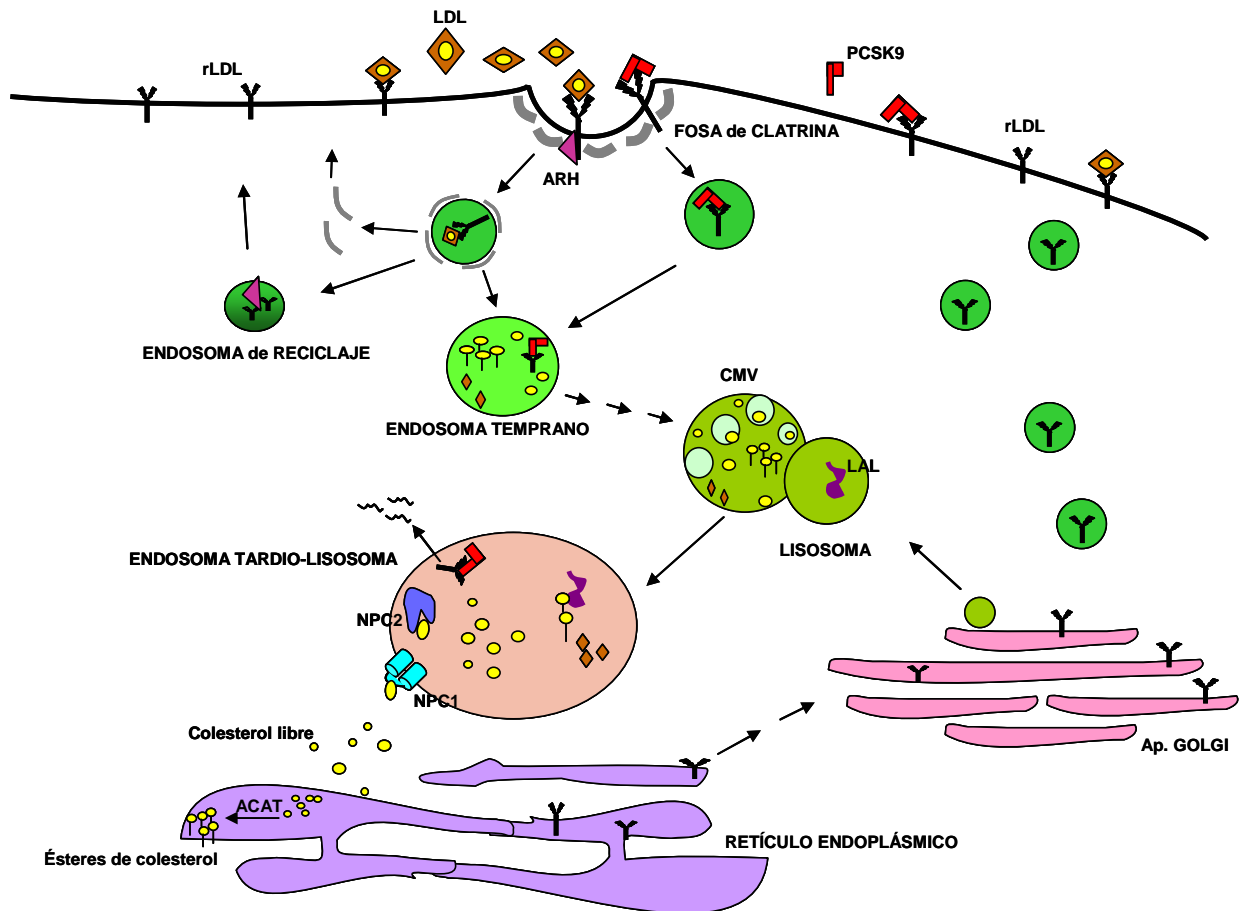
Los estudios realizados por Goldstein y Brown sobre las causas de la hipercolesterolemia familiar (FH) llevaron al descubrimiento, en 1973, de un receptor de la superficie celular para las LDL, así como del mecanismo implicado en la captación de las mismas. El rLDL es una proteína de la membrana plasmática de las células de la mayoría de los tejidos que media en la captación de las partículas LDL, entre otras, mediante el mecanismo de endocitosis, el cual da lugar a la degradación lisosomal de la partícula lipoproteica. Este receptor es responsable de la captación de más del 70 % de las LDL plasmáticas, proceso que ocurre principalmente en el hígado, donde tiene una elevada presencia, al igual que en ovario y glándulas adrenales. Por lo tanto, la actividad del rLDL es un determinante clave de la concentración plasmática de LDL. Este receptor reconoce y se une con alta afinidad a regiones ricas en Arg y Lys contenidas tanto en la apo B-100 como en la apo E, apolipoproteínas que están presentes, una o bien ambas, en las LDL, VLDL, IDL, quilomicrones y una subpoblación minoritaria de HDL (HDL-1) [55].

El rLDL se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso como un precursor con una secuencia hidrofóbica de 21 aminoácidos (aa) que constituyen el péptido señal [56]. Esta secuencia es escindida en el proceso de translocación al retículo endoplásmico, por lo que no aparece en el receptor maduro. El péptido sufre un proceso de glicosilación (N

y O-glicosilación) en el retículo endoplásmico y, tras su transporte al aparato de Golgi, tiene lugar el procesamiento final de los carbohidratos. Como consecuencia de esta última transformación, la molécula pasa de tener un peso molecular de 120 kD a los 160 kD de la proteína madura, aumento en parte aparente, ya que es debido a un aumento en la cantidad de carbohidratos y también a un cambio conformacional de la glicoproteína. Una vez finalizada la síntesis del receptor, este se ubica en la superficie celular, concentrándose posteriormente en las fosas cubiertas de clatrina, lo cual no es requisito para que se produzca la interacción con la LDL, que puede ser previa [57] (**esquema 3**). Tanto si se ha producido como si no la interacción del rLDL con su ligando, dichas fosas se invaginan, para formar vesículas endocíticas, las cuales, previa separación de la cubierta de clatrina, se fusionan con otras para dar lugar a los endosomas [58]. En la endocitosis del rLDL hepático coopera la proteína adaptadora denominada ARH (*autosomal recessive hypercholesterolemia protein*), que permite al receptor unirse a la clatrina de la fosa [59,60] (**esquema 3**).

En el endosoma el pH disminuye hasta un valor menor a 6,5, gracias a la acción de una bomba de protones dependiente de ATP que opera en la membrana del mismo. Este pH ácido permite la disociación de la partícula de LDL y el receptor. Una parte de los receptores retornan a la membrana mediante la formación de vesículas exocíticas, proceso en el que también está implicada ARH [61]. Se ha estimado que el rLDL completa un ciclo cada 10 min, repitiéndose el mismo hasta 150 veces [55]. No obstante, no todas las moléculas de receptor son recicladas a la membrana, sino que parte de ellas son degradadas tras la fusión del endosoma con los lisosomas; esta degradación es promovida, de manera regulada, por una proteína denominada PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) que se une al receptor en el espacio extracelular [62] (**esquema 3**) (ver 1.4.4. Regulación del receptor de LDL). En el lisosoma, las partículas de LDL, ya disociadas del receptor, se degradan, de forma que el componente proteico es hidrolizado a aminoácidos; los ésteres de colesterol y los triglicéridos son hidrolizados por acción de la lipasa ácida lisosomal, y los fosfoacilglicéridos y esfingolípidos, por las correspondientes enzimas lisosomales. Los lípidos simples así formados, con especial mención del colesterol libre en el caso de las LDL, atraviesan la membrana lisosomal y son utilizados por la célula para las diversas funciones. Parte del colesterol puede almacenarse en el citoplasma previa esterificación

con un ácido graso mediante la ACAT-1 (*acyl-CoA cholesterol acyl-transferase 1*), localizada en el retículo endoplásmico [63].



Esquema 3. Endocitosis mediada por el rLDL. CMV, cuerpos multivesiculares; LAL, lipasa ácida lisosomal.

El transporte del colesterol al exterior de los compartimentos endosomal/lisosomal es ejercido por dos proteínas denominadas, NPC1 y NPC2 (*Niemann-Pick type C1 y C2*) que se encuentran, la primera de ellas, en el endosoma tardío y transitoriamente en el lisosoma y el aparato de Golgi, está insertada en la membrana y es capaz de unir esteroides mediante un dominio SSD (*sterol-sensing domain*). NPC2 es soluble y está en el interior del orgánulo. Se ha propuesto que el colesterol libre procedente del colesterol esterificado se asocia con NPC2 y este lo transfiere a NPC1, que posibilita que dicho colesterol atraviese la membrana del lisosoma. Mutaciones en estas proteínas dan lugar a la enfermedad denominada de Niemann-Pick del tipo C, en la que puede encontrarse mutada NPC1, lo que sucede en

el 95 % de los casos, o NPC2 [64]. Esta es una enfermedad fatal que se caracteriza por hepatoesplenomegalia y progresiva degeneración del sistema nervioso central. Ocasiona el almacenamiento del colesterol libre, esfingolípidos y otros lípidos en los endosomas/lisosomas de diferentes tejidos y cerebro; como consecuencia de ello, la síntesis de colesterol y la captación de partículas de LDL están elevadas, y la esterificación de colesterol reducida [65].

1.4.2. Estructura

El receptor está codificado por un gen (*LDLR*) localizado en el cromosoma 19p y el cual posee 18 exones y 17 intrones y codifica una proteína de 860 aa, incluyendo una secuencia de 21 aa que constituye el péptido señal. El promotor está situado en el extremo 5' y contiene en su región proximal 3 secuencias repetidas imperfectas de 16 pb cada una, dos secuencias TATA y varios sitios de iniciación de la transcripción. Las secuencias repetidas 1 y 3 contienen sitios reconocidos por los factores de transcripción Sp1, cuya función es mantener la expresión basal del gen, independientemente de la regulación por esteroides. Cuando la célula requiere esteroides es necesaria la contribución de la secuencia repetida 2, que contiene un elemento SRE-1 (*sterol regulatory element-1*), de 10 pares de bases, para aumentar la transcripción mediante la unión del factor SREBP, el cual se activa en respuesta a una disminución de la concentración celular de esteroides. Solapándose con una de las dos cajas TATA se encuentra un elemento al que se denominó SIRE (*sterol-independent regulatory element*).

El rLDL es una proteína muy conservada constituida por 5 dominios estructurales que se corresponden con la organización exónica del gen. El exón 1 codifica la región 5', que corresponde a la secuencia del péptido señal mencionada anteriormente (**esquema 4**).

El primer dominio estructural, codificado por los exones 2 al 6, se corresponde con el extremo N-terminal de la proteína; es una región muy plegada compuesta por siete repeticiones de una secuencia de ~ 40 aa, cada una de las cuales contiene seis residuos de Cys que forman entre sí tres puentes disulfuro que hacen que este primer dominio sea extremadamente estable. Este es el dominio de unión al ligando. El extremo C-terminal de cada una de las siete repeticiones es una agrupación de aminoácidos cargados negativamente, cuya secuencia es DXSDE. Esta agrupación de cargas negativas va a permitir la interacción con las cargas positivas de las regiones

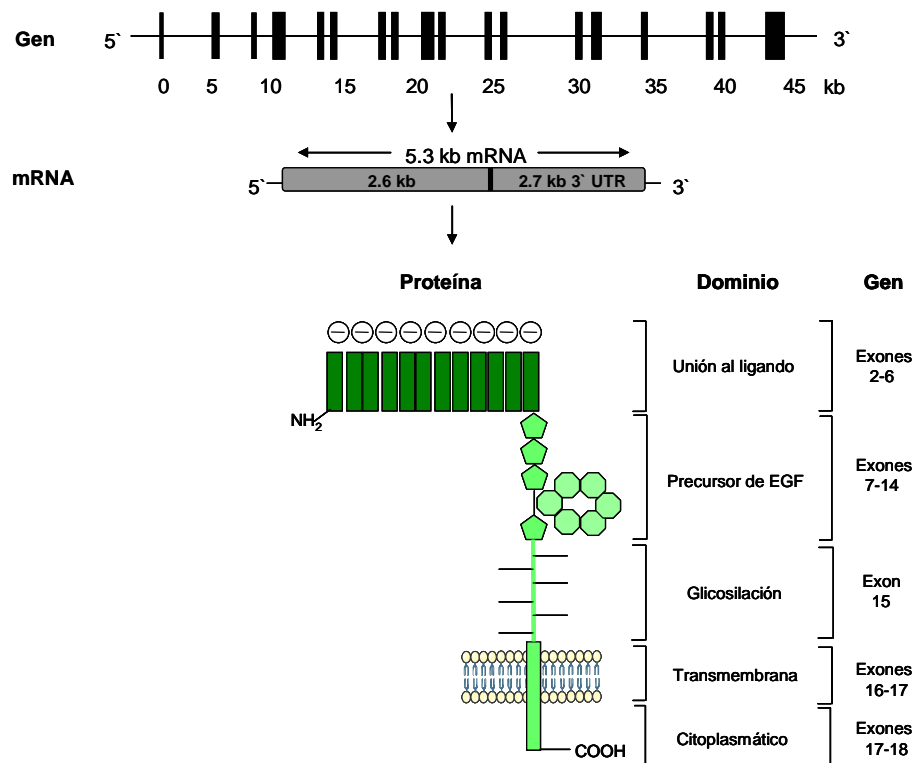
ricas en Arg y Lys presentes en apo B y apo E. Cada uno de los exones 2 al 6 codifica una repetición, a excepción de las repeticiones tercera, cuarta y quinta, todas ellas codificadas en el exón 4 (**esquema 4**).

El segundo dominio, codificado por los exones 7 al 14, está formado por 400 aa y presenta un 35 % de homología con la porción del dominio extracelular del precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), y posee tres repeticiones del EGF, de 40 aa cada una y ricas en Cys. Las dos primeras repeticiones (A y B) están próximas entre sí y se encuentran separadas de la tercera por una secuencia de 280 aa que contiene cinco copias del motivo conservado YWTD, el cual se repite cada 40-60 aa. Este dominio es necesario para el correcto posicionamiento del dominio de unión al ligando en la superficie celular. Además, se requiere para la disociación del rLDL y su ligando en el endosoma, cuyo pH ácido induce la interacción de una región de hélice β de este dominio con las repeticiones cuarta y quinta del primer dominio, desplazando así a la partícula lipoproteica [66] (**esquema 4**).

El tercer dominio, codificado por el exón 15, está formado por 58 aminoácidos, 18 de los cuales son Ser o Thr, lo que explica la abundancia de O-glicosilaciones. El cuarto dominio está formado por 22 aa hidrofóbicos, no conservados, que constituyen el dominio transmembrana, el cual atraviesa la membrana una sola vez. Este dominio está codificado por el exón 16 y la porción 5' del 17. El resto de este exón y el final 5' del 18 codifican el quinto dominio, que es el citoplasmático, formado por 50 aa que constituyen el extremo C-terminal de la proteína (**esquema 4**). En este dominio se encuentra la secuencia NPxY, que es la encargada, mediante la interacción con ARH, de la localización del rLDL en las fosas de clatrina. Además, facilita una rápida endocitosis [67] (**esquema 3**).

Se han identificado numerosas proteínas de membrana que contienen un número variable de regiones o secuencias homólogas a las contenidas en los dominios primero, segundo y quinto que acabamos de describir para el rLDL, conformando todas la conocida como familia del rLDL. Entre ellas, se encuentran la proteína relacionada con el rLDL (LRP), el receptor de VLDL (rVLDL), el receptor 2 de la apo E (apoER2) y la megalina o gp 330. Todas tienen en común que pueden unirse a la apo E, pero también reconocen otros múltiples ligandos. Su función excede a la participación en el metabolismo lipoproteico; así, varias de estas proteínas median en la transducción de

señales, como, por ejemplo, rVLDL y apoER2, que están implicados en procesos de migración neuronal durante el desarrollo cerebral [68].



Esquema 4. Gen, mRNA y proteína del receptor de LDL.

1.4.3. Mutaciones en el receptor de LDL

Se han publicado más de 1000 mutaciones que resultan en diversos efectos fenotípicos sobre la proteína del receptor. Así, se distinguen 5 clases de alteraciones [69]:

- Mutaciones de clase 1. Generan lo que se conoce como alelos nulos, ya que no se produce proteína, aunque pueden detectarse pequeñas cantidades de mRNA.

- Mutaciones de clase 2. Codifican proteínas defectuosas para el transporte entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, es decir la proteína se sintetiza pero, debido a alteraciones conformacionales, queda retenida en el primero y no llega a producirse el receptor maduro. El mayor número de mutaciones dan lugar a este fenotipo.

- Mutaciones de clase 3. Originan proteínas que no reconocen las partículas LDL. Los alelos defectuosos contienen mutaciones en los exones que codifican para el dominio de unión al ligando, pero también puede tratarse de mutaciones que afectan al dominio adyacente, homólogo al precursor de EGF.

- Mutaciones de clase 4. Corresponden a proteínas que son incapaces de albergarse en las fosas recubiertas de clatrina y, por tanto, no permiten captar las LDL unidas al receptor. Estas mutaciones afectan al dominio citoplasmático del receptor.

- Mutaciones de clase 5. Son las que dan lugar a receptores que permiten reconocer y captar la partícula, pero no la liberan en el endosoma y, por lo tanto, no se reciclan a la superficie celular, disminuyendo su concentración en la misma. Estas mutaciones suelen afectar al dominio homólogo al precursor de EGF.

Todas estas deficiencias del rLDL ocasionan un trastorno en el abastecimiento de colesterol lipoproteico por las células y, a su vez, una disminución del aclaramiento de las LDL plasmáticas. En esas condiciones, las LDL son eliminadas del plasma por otros mecanismos menos eficaces, por lo que se prolonga su tiempo de residencia en plasma, donde aumenta su concentración, y se acumulan en los macrófagos de distintos tejidos, incluida la íntima arterial.

1.4.4. Regulación del receptor de LDL

1.4.4.1. Regulación por esteroides

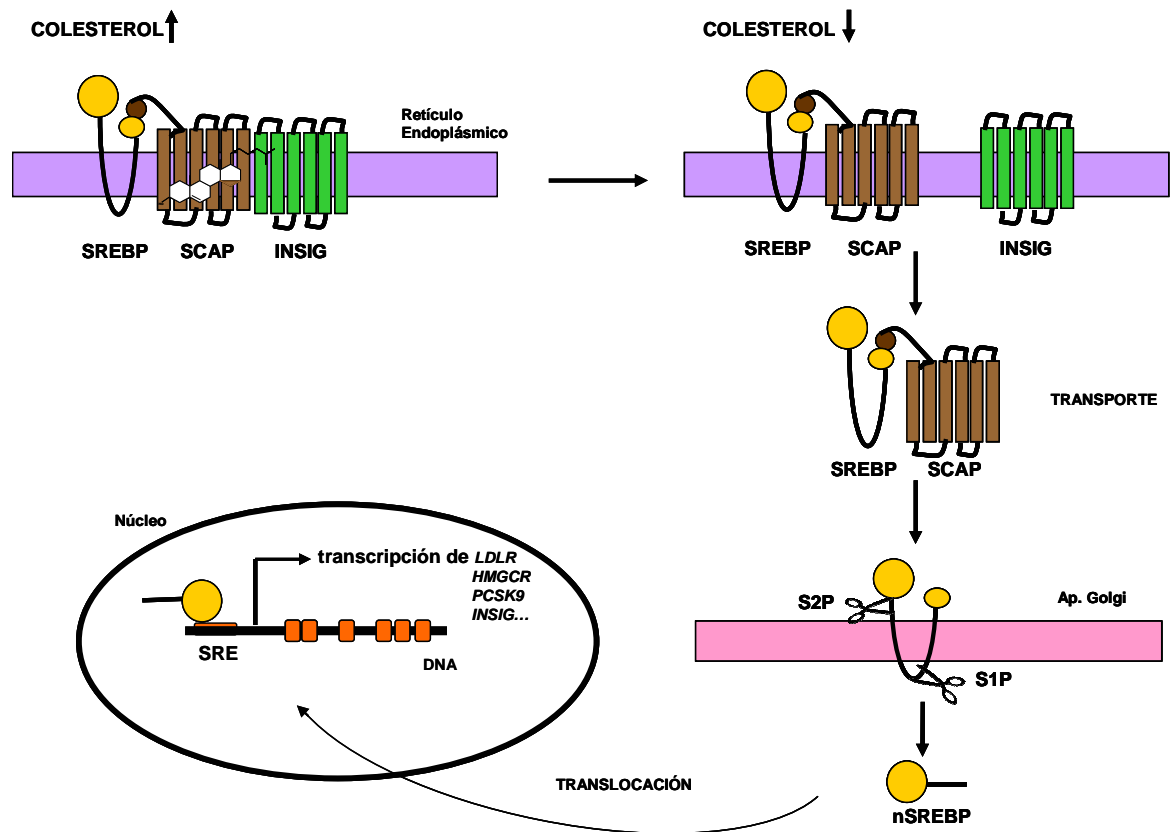
La expresión del rLDL está principalmente regulada por el contenido intracelular de colesterol, molécula esta que actúa a través de un mecanismo de retroregulación negativa [55]. En dicho mecanismo están involucrados los factores de transcripción SREBP, proteínas pertenecientes a la familia bHLH-Zip, que actúan activando la expresión de los genes implicados en la síntesis de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos, fosfolípidos y del gen del propio rLDL [70,71] (**esquema 5**).

En mamíferos, la familia de los SREBP está constituida por tres isoformas, SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2. Las dos primeras se originan a partir del mismo gen (SREBF1) y regulan la transcripción de genes implicados en la síntesis y esterificación de ácidos grasos. Además, SREBP-1a también regula la síntesis de colesterol. SREBP-2 se origina a partir de un gen distinto (SREBF2) y regula la expresión de gran parte de los genes implicados en la biosíntesis de colesterol, como hemos comentado más arriba,

y es un importante activador de la transcripción del gen del rLDL. Los SREBP se sintetizan como precursores inactivos integrados en el retículo endoplásmico. En su región N- terminal se encuentra al activador de la transcripción bHLH-Zip. Inmediatamente después de su síntesis, los SREBP se unen, mediante su región C-terminal, a una proteína del RE, que tiene dos funciones, una de escolta y otra de sensor de esteroides, y denominada SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) [72] (**esquema 5**).

Cuando el contenido celular de colesterol es elevado, este es detectado por SCAP a través de un dominio sensible a esteroides (SSD), en su extremo N-terminal, el cual se une a colesterol y sufre entonces un cambio conformacional. Esto permite a SCAP unirse a otra proteína del RE denominada INSIG (*insulin-induced gene*) y de la que existen las formas INSIG-1 e INSIG-2 [73]. Como consecuencia, el complejo SREBP-SCAP-INSIG es retenido en el retículo endoplásmico (**esquema 5**), con lo que SREBP es incapaz de alcanzar el aparato de Golgi para su escisión y posterior activación de los genes diana. Como resultado, queda inhibida la transcripción del gen del rLDL y demás genes diana. [72,74,75]. Por otro lado, determinados oxisteroides, como 22R-, 24S-, 25- o 27-hidroxicolesterol y el 24,25-epoxicolesterol, también propician la retención de SREBP-SCAP por INSIG en el RE, pero en este caso lo hacen mediante la unión de aquellos a INSIG, no a SCAP [30].

Cuando disminuye la concentración celular de colesterol, SREBP-SCAP se disocia de INSIG, lo cual hace posible la unión del complejo SREBP-SCAP a las proteínas que forman las vesículas COPII, permitiendo el traslado del complejo al aparato de Golgi [76,77], donde SREBP se procesa proteolíticamente por dos proteasas, S1P y S2P (*site-1* y *site-2 proteases*), liberándose el fragmento N-terminal, que pasa al núcleo, denominándose SREBP nuclear, donde interactúa con los elementos regulados por esteroides SRE del promotor del gen que codifica el rLDL, así como de los genes de PCSK9, HMG-CoA reductasa y otras enzimas de la biosíntesis de colesterol, activando su transcripción [78] (**esquema 5**).



Esquema 5. Regulación de la transcripción génica por la vía de SREBP en función del contenido celular del colesterol.

La activación farmacológica de la vía de SREBP estimula la expresión del rLDL y, así, es efectiva en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Los fármacos más importantes en este sentido son las estatinas, que inhiben la HMG-CoA reductasa [35]. Esta inhibición disminuye la concentración intracelular de colesterol, induciendo así la activación de SREBP e incrementando la transcripción del gen del rLDL. Como consecuencia, aumenta la expresión de este receptor y la captación de las LDL del plasma. Por otro lado, el compuesto LY295427 incrementa la expresión del rLDL gracias a su capacidad para revertir la inhibición del procesamiento de SREBP mediada por oxisteroles [79].

Además de regularse a nivel transcripcional, la expresión del rLDL se regula postranscripcionalmente mediante la modulación de la estabilidad de su mRNA, el cual tiene una vida media corta (unos 45 min en células HepG2). La estabilidad del mRNA está determinada en gran parte por la estructura de la región 3' UTR [80], que en el caso

del mRNA del rLDL contiene cuatro elementos ricos en adenilato y uridilato (ARE, *adenylate-uridylylate-rich elements*) a los que se unen proteínas específicas que regulan su vida media. Estudios recientes han mostrado que la expresión hepática de una de estas proteínas, HNRNPD (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D*), la cual acelera la degradación del mRNA del rLDL, aumenta en respuesta a una dieta rica en colesterol en el ratón [81]. Aunque el mecanismo molecular por el cual el colesterol estimula la expresión de HNRNPD no se conoce, parece ser independiente de SREBP y LXR [81].

Existen dos proteínas cuya expresión está controlada por el contenido celular de colesterol y que regulan la expresión del rLDL a nivel postraduccional. Se trata de PCSK9 e Idol. Ambas están implicadas en la degradación del rLDL, reduciendo el número de moléculas de este en la superficie celular. PCSK9 promueve dicha degradación mediante la unión al rLDL en el espacio extracelular y posterior captación en la fosa de clatrina, de modo similar a como hace el receptor con su ligando, pero en este caso pasando luego el rLDL a la vía de degradación lisosomal [82]. La expresión de PCSK9 está regulada por SREBP a través de un elemento SRE de su promotor [83] (**esquema 5**). Se sintetiza como un precursor de aproximadamente 75 kDa en el retículo endoplásmico de hígado e intestino, donde sufre un proceso autocatalítico, dando la forma madura de 62 kDa. Esta pasa al aparato de Golgi y es secretada a la membrana plasmática, donde se une a la repetición A de EGF presente en el dominio homólogo al precursor de EGF (EGFA) del rLDL. El complejo formado por rLDL y PCSK9 es incluido en el endosoma, para acabar siendo degradado el primero tras la fusión con el lisosoma [84] (**esquema 3**). La unión se realiza a un pH neutro en la membrana plasmática, y en el endosoma, cuyo pH es ácido, se acentúa la afinidad, lo que favorece la degradación final del rLDL [85].

PCSK9 consta en su estructura de un péptido señal seguido de un prodominio y un dominio catalítico [86]. Para la síntesis de la forma madura es necesaria la escisión del prodominio, aunque este permanece unido no covalentemente al dominio catalítico. Esto impide que otros sustratos tengan acceso a este dominio, por lo que la capacidad de PCSK9 para promover la degradación del rLDL es independiente de su actividad catalítica, indicando que funciona como una chaperona y no como una enzima [87,88]. Las lipoproteínas pueden modular la función de PCSK. Así, las LDL compiten por la unión al rLDL, inhibiendo su función, mientras que las HDL disminuyen la formación

de dímeros de PCSK9, formas más efectivas que las monoméricas, y las VLDL favorecen la dimerización [89].

Idol (*inducible degrader of the LDL receptor*) es una ubiquitina ligasa E3 que induce la ubiquitinación del rLDL en su dominio citoplasmático, lo que promueve la degradación del receptor. La expresión de Idol está regulada por el receptor nuclear LXR, el cual es un regulador transcripcional del metabolismo del colesterol. Así, la activación de LXR por ciertos oxiesteroles, cuya síntesis aumenta cuando aumenta el colesterol celular, estimula la exportación de este y, a la vez, induce la sobreexpresión de Idol, el cual reduce la cantidad de moléculas de rLDL y la captación de LDL [90]. La vía mediante la cual el rLDL es degradado por Idol es diferente a la utilizada por PCSK9. Idol induce la ubiquitinación del rLDL, lo cual sirve de señal para la formación de invaginaciones de la membrana que pasan, vía endosoma temprano y cuerpos multivesiculares, al lisosoma para su degradación [91].

Un estudio reciente ha descrito que la efectividad del colesterol lipoproteico para regular la expresión del rLDL y la biosíntesis de colesterol en los hepatocitos de hámster es distinta en función de la partícula captada por la célula, siendo las LDL menos efectivas que otras partículas y dedicándose su colesterol principalmente a la síntesis de VLDL [92].

1.4.4.2. Regulación independiente de esteroides.

La realizan distintos mediadores, como hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y segundos mensajeros. Los estrógenos, como el 17β -estradiol, pueden aumentar la transcripción del gen del rLDL mediante la unión de un complejo formado por el receptor de estrógenos α , un receptor nuclear, y por Sp1 a un elemento específico para Sp1 del promotor [93,94]. Asimismo, la triiodotironina aumenta la transcripción mediante la unión de su receptor nuclear a un elemento de respuesta a la hormona tiroidea del promotor del rLDL [95]. La insulina también incrementa la expresión del rLDL, pero en este caso se requiere un SRE intacto y el efecto está mediado por SREBP-1 [96]. Además, la acción de la insulina necesita la activación de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) [97,98], quinasa que puede fosforilar a SREBP-1a y SREBP-2, lo que resulta en la estimulación de la transcripción del gen del rLDL [78].

Ciertas citoquinas son capaces de estimular la transcripción de dicho gen en hepatocitos [99]. TNF α (*tumor necrosis factor*) e interleucina 1 activan la transcripción solo en ausencia de esteroides en el medio. La interleucina 6 y la oncostatina M también incrementan la expresión del rLDL. La primera de estas requiere SRE y el sitio Sp1 de la repetición 3 del promotor. En el efecto de la segunda media el elemento SIRE [100,101]. Independientemente del mecanismo implicado en la acción de estas citoquinas, en todos los casos participa la vía de ERK.

Factores de crecimiento como PDGF (*platelet-derived growth factor*), EGF y FGF (*fibroblast growth factor*) estimulan la expresión del rLDL, para lo cual requieren los sitios SRE y Sp1, así como la mediación de la fosforilación de los SREBP por ERK [102].

Análogos de segundos mensajeros, como los esteres de forbol, regulan la expresión del rLDL. Por ejemplo, el TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) aumenta la transcripción de manera dependiente de la proteína quinasa C (PKC) [103]. Por otro lado, p38, perteneciente a la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), inhibe la transcripción del gen del rLDL por supresión de la actividad de ERK [104].

Además, existe una regulación postranscripcional, que se produce principalmente a través de los mecanismos que modulan la estabilidad del mRNA del rLDL y es dependiente de la región 3' UTR [80]. Así, el PMA (*phorbol-12-myristate-13-acetate*) prolonga la vida media de aquel mRNA [105]. El ácido quenodesoxicólico y la berberina también estabilizan dicho mRNA, para lo cual necesitan de la activación de la vía de ERK [106].

1. 5. HIPERCOLESTEROLEMIA

Las alteraciones del metabolismo lipoproteico pueden ser secundarias a otras patologías o debidas a defectos genéticos, y, en su conjunto, se denominan dislipemias. Las hiperlipemias se caracterizan por un aumento de la concentración de uno o más tipos de lípidos plasmáticos. Así, puede tratarse de un aumento de la concentración de colesterol, o hipercolesterolemia, de la de triglicéridos, o hipertrigliceridemia, o bien de las de ambos, o hiperlipemia mixta. Esta última y la hipercolesterolemia predisponen a padecer enfermedad coronaria. Centrándonos en la hipercolesterolemia o, más precisamente, la elevación de la concentración del colesterol de LDL en el plasma, este

es el principal factor de riesgo modificable para la enfermedad cardiovascular. Existen diversas deficiencias genéticas conocidas que causan hipercolesterolemia.

1.5.1. Hipercolesterolemia familiar

La causa monogénica más común de hipercolesterolemia es la alteración de la función del rLDL debida a una mutación en el gen que lo codifica, dando lugar a la que se conoce clásicamente como hipercolesterolemia familiar (FH). Descrita por Burns en 1920, sus características fundamentales son una elevada concentración de cLDL y lesiones arteriales que contienen depósitos de colesterol. En 1930, Müller y Thanhauser ampliaron los estudios apuntando la posibilidad de una enfermedad hereditaria, confirmándolo en 1960 Khachadurian. En 1972, Langer y colaboradores demostraron que las elevadas concentraciones de cLDL eran debidas a una disminución del catabolismo de estas partículas, y Goldstein y Brown, en 1973, demostraron que la razón de esta disminución era un defecto en la expresión de una proteína específica de la superficie celular, el rLDL [107].

La FH es una enfermedad hereditaria de transmisión autosómica dominante con penetrancia de casi el 100%, caracterizada por elevadas concentraciones de cLDL en plasma, aparición de depósitos de colesterol en diversos tejidos que se manifiestan por la presencia de xantomas, que son depósitos de esteres de colesterol que se acumulan en el interior de macrófagos y en el espacio intersticial de tejidos blandos y tendones extensores de la mano, codo, aquíleos y rotulianos, produciendo deformidades y engrosamientos superficiales. También aparecen xantelasmas, o depósitos de colesterol en los párpados, y arco corneal, o depósitos de esteres de colesterol en el borde externo de la córnea. Los pacientes con FH tienen mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular temprana, debida a la formación de placas de ateroma al acumularse colesterol en la íntima arterial, siendo esta la manifestación clínica más grave [108].

Los individuos que tienen uno de los alelos mutados poseen, en general, una prevalencia de 1/500 y concentraciones de cLDL (300-500 mg/dl) dos o tres veces más altas de las normales, existiendo cierta variabilidad en esta concentración de unos individuos a otros relacionada con factores genéticos y ambientales. Los individuos con los dos alelos mutados (homocigotos y heterocigotos compuestos) tienen una prevalencia de 1/1.000.000 y presentan concentraciones de cLDL superiores a 600 mg/dl ya desde la niñez, las cuales se modifican poco a lo largo de la vida del sujeto.

Dependiendo del grado de actividad de su rLDL, estos pacientes pueden clasificarse en dos grupos: negativos, con menos del 2 % de la actividad normal, que se asocia a baja supervivencia si no son tratados, y con receptor defectuoso, con 2-25 % de actividad y mejor pronóstico [108].

Como se ha mencionado anteriormente, se han descrito más de 1.000 mutaciones diferentes del rLDL, que se distribuyen a lo largo de 18 exones, intrones y región promotora del gen, incluyendo mutaciones puntuales, inserciones y deleciones. Puede encontrarse un elevado número de ellas en poblaciones genéticamente heterogéneas, como es el caso de España, con una prevalencia relativamente alta, estimándose en unos 80.000-100.000 casos, o bien pueden encontrarse pocas mutaciones distintas en aquellas poblaciones con efecto fundador, como canadienses franceses, libaneses cristianos, drusos, finlandeses sudafricanos y judíos asquenazí de origen lituano [109].

1.5.2. Apo B defectuosa familiar

Producida por mutaciones en el gen de la apo B-100, localizado en el cromosoma 2, que impiden que las LDL sean reconocidas por el rLDL. Se han encontrado 3 mutaciones causantes de esta hipercolesterolemia, la más frecuente de las cuales es R3500Q [110-112].

El defecto familiar de apo B (FDB) produce un fenotipo semejante al de la FH, es decir, elevadas concentraciones plasmáticas de cLDL, xantomas y aterosclerosis prematura. Posee una frecuencia de 1/1.000 en el centro de Europa. Los individuos con estas mutaciones presentan cuadros clínicos menos severos pero de características similares a las de los que presentan mutaciones en el rLDL, por lo que para su diagnóstico diferencial se recurre a la realización del estudio genético. El tratamiento es similar al de la FH [113,114] (ver 1.5.7. Tratamiento de la hipercolesterolemia).

1.5.3. Hipercolesterolemia asociada a PCSK9

Hipercolesterolemia causada por mutaciones que inducen la ganancia de función en PCSK9, también denominada NARC-1 (*neural apoptosis-regulated convertase 1*), implicada en la degradación del rLDL (**esquema 3**), reduciendo así la cantidad de este en la superficie celular [115], tal y como se ha comentado más arriba. Las mutaciones en PCSK9 que inducen la pérdida de función producen hipocolesterolemia.

Los pacientes con esta hipercolesterolemia son clínicamente indistinguibles de los sujetos con FH heterocigota y FDB. Las alternativas posibles de tratamiento se basan en el silenciamiento o bloqueo de la expresión del gen o la inhibición de la acción de PCSK9 mediante anticuerpos monoclonales (ver 1.5.7. Tratamiento de la hipercolesterolemia).

1.5.4. Hipercolesterolemia autosómica recesiva

Causada por una mutación en el gen LDLRAP1, que codifica una proteína adaptadora denominada ARH (*autosomal recessive hypercholesterolemia*), la cual media, aunque no en todos los tipos celulares, la captación de las LDL a través del rLDL, causando su deficiencia una disminución en el aclaramiento del cLDL plasmático [116]. Con fenotipo similar al de la FH homocigota, la hipercolesterolemia autosómica recesiva es menos severa y tiene mejor respuesta a las terapias convencionales (ver 1.5.7. Tratamiento de la hipercolesterolemia).

La proteína ARH posee un dominio de unión a fosfotirosina, común en proteínas adaptadoras que intervienen en señalización y transporte, que se une a secuencias NPxY del dominio citoplasmático de receptores de membrana, como el del rLDL. Además, ARH puede unirse a la AP-2 y a la cadena pesada de la clatrina (**esquema 3**), proteínas localizadas en la fosa de clatrina, facilitando la incorporación del rLDL a la misma y la endocitosis de las partículas LDL [59,61]. Dicha proteína se requiere para la función del rLDL en hepatocitos y linfocitos, pero no en fibroblastos [117], quizás debido a que en los hepatocitos las moléculas de rLDL aparecen diseminadas por la superficie celular, mientras que en los fibroblastos están agrupadas en las fosas de clatrina, lo que puede indicar que el proceso de endocitosis del rLDL difiere entre unas células y otras, o que en los fibroblastos la endocitosis está mediada por otro tipo de proteína adaptadora.

1.5.5. Sitosterolemia

Es un trastorno autosómico recesivo como consecuencia de una mutación en uno de los dos genes que codifican para los semitransportadores ABCG5 y ABCG8, respectivamente, implicados en la exportación del colesterol de las células de la mucosa del intestino delgado y los hepatocitos. Estas proteínas, que pertenecen a la familia ABC (*ATP-binding cassette protein, subfamily G*) y forman un heterodímero [118], son las responsables de devolver los esteroides, y principalmente los de origen vegetal,

absorbidos por los enterocitos, a la luz intestinal y de transportar los esteroides hepáticos hacia el conducto biliar. Los individuos con un defecto en ABCG5 y ABCG8 presentan concentraciones plasmáticas de colesterol y sitosterol, entre otros fitosteroides, elevadas, así como xantomas y enfermedad cardiovascular prematura. El tratamiento de esta patología se realiza con ezetimibe (ver 1.5.7. Tratamiento de la hipercolesterolemia).

1.5.6. Deficiencia de colesterol 7 α -hidroxilasa

La principal vía de excreción del colesterol requiere la síntesis de ácidos biliares. La enzima limitante implicada en la vía clásica de conversión del colesterol en ácidos biliares es la colesterol 7 α -hidroxilasa, perteneciente a la familia del citocromo P450 [119]. Dicha enzima está codificada por el gen CYP7A1, cuya deficiencia es la responsable de la disminución de la producción de los ácidos biliares y la acumulación de colesterol en el hígado, reduciendo la actividad del rLDL hepático y causando hipercolesterolemia. Esta hipercolesterolemia cursa con litiasis biliar, la cual se debe a la dificultad para solubilizar el colesterol originada por la deficiencia de sales biliares.

1.5.7. Tratamiento de la hipercolesterolemia

El tratamiento de la hipercolesterolemia, que intenta rebajar las concentraciones de colesterol, implica ejercicio, dieta y la administración de fármacos que disminuyen las concentraciones plasmáticas de colesterol, ya sea por reducción de su producción o de su absorción intestinal o bien incrementando la eficiencia de su eliminación del plasma. El empleo de estatinas ha sido una alternativa de primera línea para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Estos compuestos son potentes inhibidores de la HMG-CoA reductasa, enzima reguladora de la tasa de biosíntesis del colesterol, y, como consecuencia, aumentan la captación de LDL mediante el incremento de la expresión de su receptor [35]. Aunque las estatinas suelen ser muy efectivas, la respuesta a las mismas puede ser desigual, existiendo incluso individuos refractarios a dicho tratamiento [120], recurriéndose entonces a terapias alternativas.

Las resinas secuestradoras de ácidos biliares inhiben la reabsorción de los ácidos biliares uniéndose a ellos en el intestino y, por tanto, fomentan la conversión del colesterol hepático en ácidos biliares y, secundariamente, la expresión del rLDL. Las resinas más utilizadas son colestiramina, colestipol y colesevelam [121]. Por otro lado, ezetimibe inhibe la absorción intestinal de colesterol y fitosteroides. La diana de este fármaco es la proteína transportadora NPC1L1 [122].

Para aquellos pacientes que no toleran el tratamiento farmacológico, que son refractarios al mismo o que carecen por completo de rLDL funcional existe el procedimiento de la aféresis de LDL. Es el tratamiento de elección en la FH homocigota e indicado en FH heterocigota grave con cardiopatía isquémica [123].

Existen nuevos fármacos para reducir las concentraciones de cLDL en aquellos pacientes con FH homocigota o con FH heterocigota severa, como son los inhibidores de la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP). Esta proteína transfiere triglicéridos y colesterol a la apo B de las VLDL nacientes, precursoras de las LDL, por lo que la inhibición de aquella reduce la síntesis de estas partículas. Lomitapide es un inhibidor específico de MTP [124]. Otra estrategia para reducir la síntesis de VLDL es la administración de oligonucleótidos antisentido (ASO), que consisten en secuencias cortas de RNA químicamente modificadas y complementarias a un segmento del mRNA diana, al cual se unen, induciendo su degradación. Mipomersen es un oligonucleótido antisentido que tiene como diana el mRNA de la apo B-100, componente esencial de VLDL, IDL y LDL, y cuya administración subcutánea inhibe la síntesis de dicha apolipoproteína [125].

Otra aproximación farmacológica que se está mostrando muy prometedora es la inhibición de PCSK9. Es el caso de la administración de los anticuerpos monoclonales REGN727/SAR236553 (alirocumab) y AMG145, que pueden producir intensas reducciones de la concentración de cLDL [126]. En estudios con modelos animales también se ha planteado el silenciamiento del gen de PCSK9 mediante la utilización de ASO o RNA de interferencia (siRNA), que consiste en un pequeño fragmento de RNA de doble cadena que se une a su mRNA diana en secuencias específicas [127,128]. En estudios con células HepG2 se ha utilizado un péptido que imita el dominio EGFA del rLDL, con el que interactúa PCSK9, inhibiendo así la acción de este [129].

Dado que las estatinas incrementan la expresión de PSCK9 [130], la inhibición de esta proteasa ha despertado un gran interés como tratamiento adyuvante para incrementar la efectividad de aquellas. Sin embargo, se ha descrito que la combinación de ambos efectos puede provocar citotoxicidad por acumulación de grasa en las células β del páncreas [131] y la degradación de los canales de sodio epiteliales (ENaC), aumentando así el riesgo de hipertensión [132].

1.6. MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

1.6.1. Receptores de estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroídicas que ejercen importantes efectos sobre la fisiología y patología humana. Intervienen principalmente en el desarrollo, diferenciación y funcionamiento del sistema reproductor. Además, regulan el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular, nervioso, gastrointestinal, músculo-esquelético e inmune. También participan en múltiples enfermedades, como cáncer, osteoporosis, hipertensión, obesidad, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, inmunes y cardiovasculares. La mayoría de estos efectos son realizados a través de los receptores de estrógenos (ER) y de diversas vías de señalización celular. Los ER son proteínas intracelulares que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares, los cuales actúan como factores de transcripción cuando están unidos a su ligando. Regulan la actividad transcripcional de determinados genes de aquellas células que son diana de la acción de estrógenos como el 17β -estradiol. Los tejidos diana de los estrógenos son mama y útero principalmente y, además, cerebro, corazón, hígado y hueso [133].

Existen dos tipos de ER, denominados α y β . De este último se han descrito cinco isoformas denominadas ER β 1-5 [134]. La expresión de los ER es diferente entre distintos tejidos. ER α es predominante en ovario, útero, mama, próstata, testículo, riñón, hígado, tejido adiposo, hueso y cerebro. ER β se expresa en ovario, próstata, testículo, colon, glándulas salivares, sistema vascular, pulmón, hueso y cerebro. Las cantidades relativas de los distintos ERs son determinantes en la respuesta a sus ligandos. Así, en ciertas células un incremento de la expresión de ER β respecto a ER α inhibe la respuesta a 17β -estradiol mediada por este receptor [135].

1.6.1.1. Estructura

ER α y ER β están codificados por genes diferentes localizados en distintos cromosomas. Están constituidos por cinco dominios (A hasta F) que se corresponden con distintas funciones. La región N-terminal contiene los dominios A/B, cuya función es la de activación de la transcripción mediante el dominio AF-1 (*activation function 1*). Posee varios sitios de fosforilación y es esencial en la interacción con proteínas correguladoras y relacionadas con la actividad transcripcional independiente de hormonas. El dominio C, denominado DBD (*DNA binding domain*) se une al DNA mediante dos estructuras en dedos de zinc, las cuales interaccionan con el elemento de

respuesta a estrógenos (ERE) del promotor. Es una región que juega un papel importante en la dimerización del receptor. A continuación se encuentra el dominio D, o bisagra, que está implicado en el traslado del receptor desde el citoplasma, donde se sintetiza, al núcleo y en la dimerización del mismo. El dominio E/F se encuentra en la región C-terminal y es el de unión al ligando, o LBD (*ligand binding domain*). La mayor parte de esta región está implicada en la unión al ligando, y además, en la dimerización, en la interacción de los ER con proteínas correguladoras y en la activación de la transcripción mediante el dominio AF-2. Mientras el receptor permanece inactivo, A/F está unido a una proteína chaperona denominada hsp90 (*heat shock protein 90*), que estabiliza el receptor. La función del dominio F no está bien definida, pero este puede estar involucrado en el efecto de la actividad agonista/antagonista de los moduladores selectivos de los ER (ver más abajo) y en interacciones con correguladores [133].

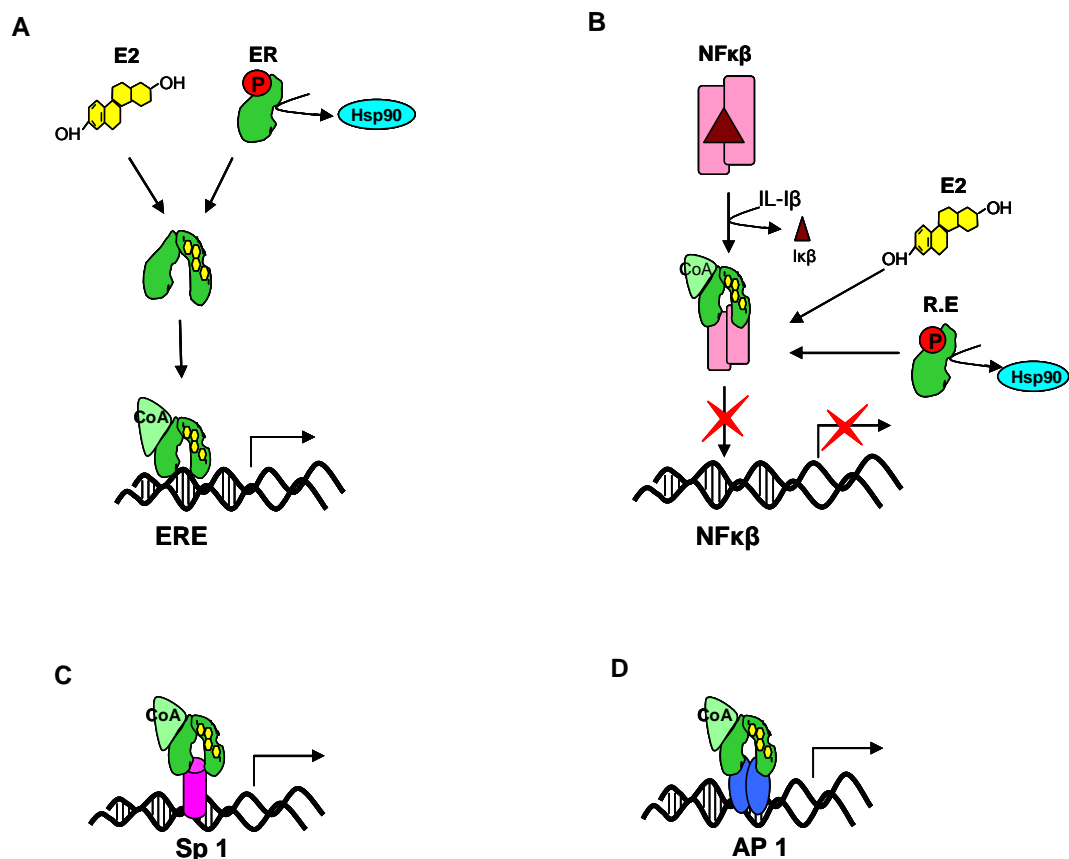
Ambos ER tienen parecida estructura, siendo el dominio DBD aquel en el que presentan la mayor homología entre ellos (95 %). ER β carece de una porción del dominio F y ambos ER divergen en la región de activación de la transcripción AF-1, habiéndose observado que la actividad de la misma es mucho menor en ER β que en ER α . Esta diferencia parece ser una de las razones de la distinta respuesta a varios ligandos y podría explicar la distinta acción en los diferentes tejidos [136]. Por otro lado, ambos ER pueden formar dímeros entre sí, bien con receptores del mismo tipo (homodímeros) o bien con receptores de distinto tipo (heterodímeros) [136].

1.6.1.2. Mecanismo de acción

El principal mecanismo a través del cual los ER modulan la expresión génica implica a tres componentes: el receptor, su ligando (natural o sintético) y las proteínas correguladoras. El proceso comienza cuando el ligando, como puede ser el 17 β -estradiol, se une al sitio específico en el receptor nuclear, induciendo su fosforilación [137]. Entonces el ER se disocia de hsp90 y cambia de conformación, produciéndose la dimerización de aquel. El complejo ER-estrógeno formado se une a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA (**esquema 6**), después se produce la unión de proteínas correguladoras, bien coactivadoras, como la familia p160/SRC, CBP/p300 y el complejo activador TRAP/DRIP, o bien correpresoras, como REA (*repressor of estrogen receptor activity*), N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) y SHP (*short heterodimerization partner*), que modulan y, en su caso, permiten el inicio

de la transcripción de los genes correspondientes, dependiendo del tipo celular. El mecanismo de activación de la transcripción implica la activación de AF-1 del dominio A/B y de AF-2 del dominio LBD del ER, siendo este último dominio esencial para la unión a la familia de los coactivadores SRC [138].

Además de este mecanismo, los ER pueden modular la expresión de genes a través de su interacción con factores de transcripción que se unen a otros sitios específicos del DNA diferentes a los ERE. Así ocurre con la interacción con el complejo NF- κ B, que le impide a este estimular la expresión de la interleucina 6 [139], o con la unión a los factores de transcripción Sp1 o AP-1 (complejo Fos/Jun) [94,140] (esquema 6).



Esquema 6. Mecanismos de acción de los receptores de estrógenos. (A) A través de la interacción del complejo ER-ligando con el ERE del DNA; (B, C y D) mecanismo a través de la interacción con factores de transcripción que se unen a otros elementos distintos a ERE, como NF κ B, Sp1 y AP1 respectivamente. (E2) 17 β -estradiol; (ER) receptor de estrógenos; CoA, coactivador.

Aparte de la ruta dependiente de los ER, existen vías intracelulares de señalización que median una rápida respuesta a estrógenos, como la mediada por receptores estrogénicos de membrana GPR30/GPER, acoplados a proteínas G (*G protein-coupled estrogen receptor*). Estos activan diferentes cascadas de señalización que pueden, directamente o por comunicación cruzada con otras vías, acabar estimulando mecanismos genómicos. Entre los efectos mediados por GPER se encuentran, por ejemplo, la activación de los canales de Ca^{2+} , la activación de las vías de PI3K/Akt [141], PKC [142] y MAPK/PKA [143].

1.6.2. Características y acciones de los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) son un grupo de compuestos no esteroídicos con afinidad por los receptores de estrógenos, ejerciendo una acción agonista o antagonista en función del tejido o la célula diana. Por ello, algunos SERM son muy utilizados en la clínica para tratar distintos desórdenes, como el cáncer de mama, la osteoporosis o la disfunción ovárica [144].

En función de su estructura química (**esquema 7**), se pueden clasificar en cuatro grupos:

1) Derivados del trifeniletileno. Incluyen el tamoxifeno y clomifeno como SERM de primera generación, el toremifeno, droloxifeno, idoxifeno, TAT-59, GW5638 y MDL103.323 como SERM de segunda generación, y el ospemifeno como SERM de tercera generación.

2) Derivados del benzotiofeno. Incluyen el raloxifeno, un SERM de segunda generación, así como el arzoxifeno, SERM de tercera generación.

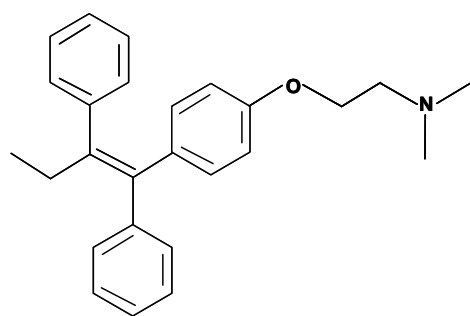
3) Derivados de los benzopiranos: acolbifeno, ormeloxifeno, levormeloxifeno, pipendoxifeno y bazedoxifeno.

4) Hidronaftalenos: trioxifeno, lasofoxifeno [145].

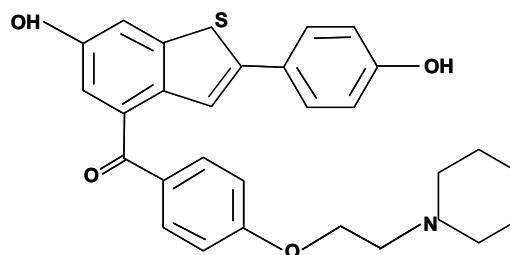
A algunas sustancias naturales con efectos estrogénicos o antiestrogénicos dependiendo del tejido diana se las ha propuesto como SERM. Entre los SERM naturales podemos destacar a las isoflavonas y el 27-hidroxicolesterol, un SERM endógeno. La genisteína y la daidzeína son polifenoles pertenecientes al grupo de las isoflavonas, abundantes en la soja, y se unen a los ER, con una afinidad mayor por ER β

que por ER α . Se ha descrito que las isoflavonas tienen efectos antiproliferativos en mama y actúan como agonistas en hueso [146]. El 27-hidroxicolesterol es un oxiesterol derivado del colesterol por acción de la enzima CYP27A1, proceso que ocurre principalmente en hígado y macrófagos, y es ligando de LXR [147]. Dicho oxiesterol se une a ER y modula su actividad, actuando como agonista en mama y antagonista en el sistema cardiovascular [148,149].

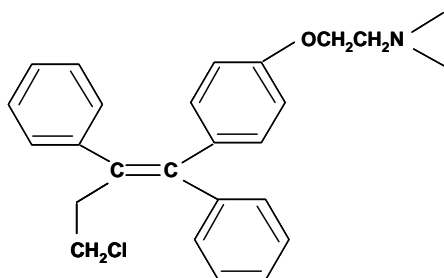
Existen, por otra parte, compuestos antiestrogénicos puros, sin acción agonista, o SERD (*selective estrogen receptor downregulator*). Entre ellos se encuentran el fulvestrant (ICI 182,780), de estructura esteroídica [150], y EM-800, no esteroídico [151].



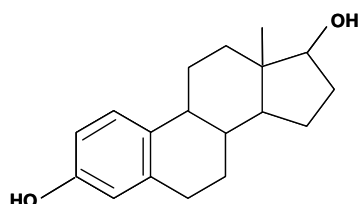
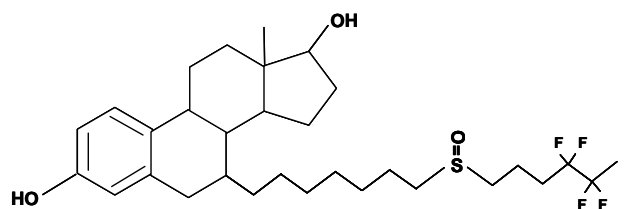
TAMOXIFENO



RALOXIFENO



TOREMIFENO

17 β -estradiol

ICI 182,780

Esquema 7. Estructura química del tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno, 17 β -estradiol e ICI 182,780.

1.6.2.1. Mecanismo de acción dependiente de los receptores de estrógenos

La capacidad de cada SERM para actuar como agonista o antagonista de los ER en función del tejido diana depende de diversos factores: 1) la afinidad con que los SERM se unen a ER α y ER β ; 2) la conformación del complejo formado tras la unión de los SERM a los ER; 3) la capacidad de este complejo para interactuar con otras moléculas, incluidos correguladores; 4) la expresión diferencial de estas moléculas y los subtipos de ER en distintos tejidos; y 5) el tipo de interacción de los complejos ER-ligando con el promotor diana [152].

Los distintos SERM pueden tener distinta afinidad por los subtipos de ER. Por ejemplo, el raloxifeno (RAL) tiene mayor afinidad por ER α que por ER β , mientras que el tamoxifeno (TAM) tiene una afinidad similar por los dos ER. Además, la expresión diferencial de ambos subtipos de ER en varios tejidos también puede determinar los efectos selectivos de los SERM. Así, se ha descrito que el aumento en la expresión relativa de ER β inhibe la acción agonista del TAM mediada por ER α , mientras que potencia su acción antagonista [135]. Un aspecto importante es que distintos ligandos del ER, incluidos los SERM, inducen distintas conformaciones en el mismo. Estas conformaciones determinan la capacidad de reclutamiento de moléculas coactivadoras y correpresoras. Así, por ejemplo, los correpresores SMRT y N-CoR reducen la actividad agonista del TAM, pero no la actividad del 17 β -estradiol. La expresión relativa de correguladores también condiciona la respuesta diferencial de los tejidos a un mismo SERM. Además, las vías de señalización que modulan la actividad de los ER pueden alterar la capacidad de reclutamiento de correguladores. Es el caso de la vía de cAMP/PKA, cuya activación incrementa la acción agonista del TAM mediante la inhibición del reclutamiento del correpresor SMRT por ER α . Por otro lado, los SERM alteran selectivamente la interacción del ER con el promotor en función de la naturaleza de esta interacción. Por ejemplo, en una línea celular uterina el TAM puede aumentar la actividad del ER α mediada por AP-1, pero es un antagonista de los efectos mediados por ERE [152].

1.6.2.2. Mecanismos de acción independientes de los receptores de estrógenos

Los SERM también pueden ejercer su efecto a través de mecanismos independientes de los ER. Así, el TAM, al igual que el antiestrógeno fulvestrant (ICI 182,780), es agonista de GPER [142]. También se ha descrito que el TAM inhibe a la

PKC en células de carcinoma de mama MDA-MB-231, carentes de ER, mediante la inducción de estrés oxidativo [153].

Algunos SERM se unen e inhiben al complejo microsomal AEBS (*antiestrogen binding site*), un complejo heteroligomérico localizado en el retículo endoplásmico y formado por dos enzimas de la ruta de biosíntesis del colesterol, la 3 β -hidroxiesterol- Δ^8 - Δ^7 -isomerasa (D8D7 o EBP) y la 3 β -hidroxiesterol- Δ^7 -reductasa (DHCR7) [154,155]. La interacción de los SERM con AEBS resulta en la inhibición de la biosíntesis de colesterol (ver apartado 1.6.2.6 Modulación del metabolismo lipídico por los SERM), pero también produce efectos antitumorales [156]. Múltiples moléculas se unen con alta afinidad e inhiben a AEBS, como los SERM TAM, 4-hidroxi-TAM (4-OH-TAM), RAL, clomifeno y derivados difenilmetano del TAM como tesmilifeno y PBPE (*N-pyrrolidino-2-[4-(benzyl)-phenoxy-ethanamine*). También lo inhiben sustancias naturales, incluyendo esteroides oxidados en el anillo B, como el 7-cetocolesterol y 7-deshidrocolesterol-5,6-epóxido, que son productos de la autooxidación del zimosterol y el 7-deshidrocolesterol, respectivamente, y, por último, ácidos grasos polinsaturados, como el docosahexaenoico y el araquidónico. Además, AEBS se une a antidepresivos tricíclicos y compuestos antiarrítmicos, pero no tiene afinidad por los estrógenos ni por los antiestrógenos no catiónicos, como ICI 182,780 [154].

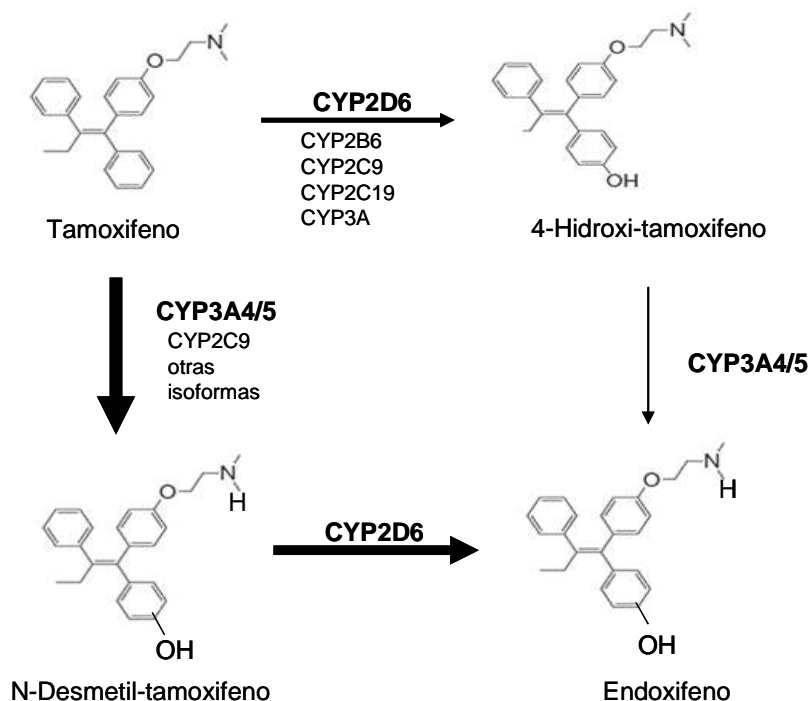
1.6.2.3 Tamoxifeno

Es el fármaco más utilizado en el tratamiento y prevención del cáncer de mama. Se usa como adyuvante en cáncer recurrente y en pacientes con metástasis. No obstante, en la mayoría de las mujeres premenopáusicas se utiliza como terapia única. El TAM bloquea el efecto mitogénico del 17 β -estradiol mediante competición por los ER en las células tumorales de mama positivas para ER. Presenta efectos agonistas en hueso, sistema cardiovascular y endometrio, aumentando el riesgo de cáncer de útero y tromboembolismo [144]. El efecto agonista del TAM en el útero puede ser atribuido, al menos en parte, al coactivador SRC-1, el cual es más abundante en útero que en mama [157].

Debido a la baja afinidad del TAM por el ER, al primero se le considera un profármaco. In vivo, el TAM es objeto de la acción catalítica de diversas enzimas, principalmente hepáticas, y pertenecientes a la familia del citocromo P450 (CYP450) para dar lugar a metabolitos con mayor potencia. Las transformaciones que sufre el TAM pueden dividirse en dos fases: una primera fase en la que se sintetizan los

metabolitos activos y una segunda en la que estos se transforman en compuestos inactivos mediante conjugación. En la primera fase, el TAM puede transformarse mediante dos vías alternativas por la acción de diferentes enzimas CYP450 (**esquema 8**). Principalmente mediante la acción de CYP2D6, se obtiene el 4-OH-TAM, primer metabolito activo, aunque minoritario, mientras que por acción de CYP3A4/5 se obtiene el metabolito mayoritario N-desmetil-TAM, el cual es un débil antiestrógeno. Estos metabolitos primarios sufren transformaciones adicionales. Tomando como sustrato a N-desmetil-TAM y por la acción de la CYP2D6 se obtiene el 4-hidroxi-N-desmetil-TAM, también denominado endoxifeno, el otro metabolito activo (**esquema 8**). A partir del 4-OH-TAM también se obtiene, mediante desmetilación por CYP3A4/5, endoxifeno y, por otro lado, también puede obtenerse el 3,4-dihidroxi-TAM [158].

La inactivación de estos productos se realiza en la segunda fase de transformaciones mediante isoformas hepáticas de sulfotransferasas, como SULT1A1, y de UDP-glucuronosiltransferasas, como UGT 2B15, lo cual promueve su excreción [159].



Esquema 8. Ruta de la biotransformación del tamoxifeno y de las principales enzimas implicadas. El grosor de las flechas indica la contribución relativa de cada conversión y las enzimas en negrita corresponden a las principales isoformas de P450 responsables de cada transformación. Modificado de Jin, Y. *et al. J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 30-37 (2005).

Ambos metabolitos activos, 4-OH-TAM y endoxifeno, poseen similar afinidad por los ER que los estrógenos, siendo entre 30 y 100 veces más potentes que el TAM, y ambos producen similares efectos *in vitro* sobre la proliferación inducida por estrógenos y la expresión génica. Sin embargo, el endoxifeno es considerado el metabolito más importante, ya que en pacientes tratados con TAM presenta concentraciones entre 5 y 7 veces mayores que el 4-OH-TAM [160].

El gen que codifica la enzima CYP2D6, crucial para la generación de los derivados activos del TAM, es polimórfico, al igual que lo son los genes codificadores del resto de enzimas CYP450 implicadas en el metabolismo del TAM. Aquel gen presenta gran variabilidad entre individuos, lo cual influye en la eficacia de la actividad de la enzima, por lo que constituye un importante predictor de la eficacia del TAM. CYP2D6 se expresa predominantemente en hígado y, en menor grado, intestino. Los linfocitos poseen una forma truncada del mRNA y no presentan actividad detectable de CYP2D6 [161]. Esta enzima es responsable del metabolismo de aproximadamente el 25 % de los fármacos, como antidepresivos, antipsicóticos, antiarrítmicos y β -bloqueantes [162]. Por otro lado la actividad de CYP2D6 puede ser influenciada por diversos fármacos comunes, que la inhiben intensa (por ejemplo, la paroxetina) o moderadamente (por ejemplo, la duloxetina) [158].

El tratamiento con TAM disminuye las concentraciones plasmáticas de cLDL, apo B y Lp(a) [163]. Con menor regularidad, se ha descrito que dicho fármaco aumenta la concentración de triglicéridos, si bien el incremento es clínicamente insignificante en la mayoría de los pacientes [163,164]. A pesar de los efectos favorables sobre la concentración de colesterol circulante, el tratamiento con TAM no está claramente asociado a efectos beneficiosos, ni tampoco adversos, en relación con la enfermedad coronaria [144], lo cual no corrobora los hallazgos realizados en los estudios preclínicos y primeros estudios clínicos, que sí señalaban que el TAM producía efectos cardiovasculares beneficiosos [165]. Los estudios preclínicos describieron una reducción en la concentración circulante y aórtica de la citoquina antiinflamatoria TGF- β en ratones tratados con TAM, y se atribuyó a esta el efecto beneficioso sobre el desarrollo de aterosclerosis [166]. Aunque se ha constatado que en mujeres tratadas con este SERM se produce un aumento en la expresión de TGF- β en biopsias de cáncer de mama [167], en humanos no se ha podido confirmar la anterior hipótesis respecto a la aterosclerosis.

La biodisponibilidad del TAM es del 80-85 % y alcanza las máximas concentraciones plasmáticas a las 4-5 h de su administración. Tiene una vida media de 27,7 h.

1.6.2.4. Raloxifeno

Usado en el tratamiento y prevención de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas, dado que en hueso tiene, al igual que el TAM, un efecto estrogénico y aumenta la densidad mineral ósea. Tiene efecto antagonista en el tejido mamario y reduce la incidencia de cáncer de mama en un 76 % sin incrementar el riesgo de cáncer de endometrio [168]. En Estados Unidos también está indicado frente al cáncer de mama invasivo [144]. El RAL, al igual que el TAM, no tiene efectos coronarios beneficiosos ni dañinos, pero también puede producir tromboembolismo [144]. El RAL reduce las concentraciones de cLDL y apo B, y no incrementa las de triglicéridos [163].

La dosis habitualmente utilizada (60 mg/día) es mayor que la de TAM (20 mg/día). Tiene una vida media de 25 h y su biodisponibilidad es del 2 % [169]. Se biotransforma a sus conjugados glucuronados en el sistema enterohepático, lo cual no solo reduce su biodisponibilidad, sino también su afinidad por los ER. Sin embargo, estos derivados pueden reconvertirse en RAL en diversos órganos [170].

1.6.2.5. Toremifeno

El toremifeno (TOR) tan solo difiere del TAM por la presencia de un átomo de Cl en la posición 4. Es utilizado en mujeres posmenopáusicas con metástasis de cáncer de mama. Se ha descrito que incrementa el riesgo de cáncer de endometrio, ictus y embolismo pulmonar en menor medida que el TAM [144].

Como en el caso del TAM, el TOR es desmetilado por CYP3A4 para producir N-desmetil-TOR, su metabolito circulante mayoritario. Sin embargo, los derivados 4-hidroxilados del TOR y N-desmetil-TOR se forman a una tasa mucho menor que la correspondiente a los respectivos análogos del TAM, probablemente debido al átomo de Cl presente en el TOR [171].

El TOR también reduce la concentración de cLDL, así como la de apo B y la de Lp(a), pero su efecto sobre el perfil lipídico puede ser más favorable respecto a los efectos de TAM y RAL, puesto que se ha observado que en los pacientes tratados con TOR se incrementan las concentraciones de cHDL y no varían las de triglicéridos [163,172]. No obstante, esta no es una observación general [173].

1.6.2.6 Modulación del metabolismo lipídico por los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos

Como se ha expuesto anteriormente, el tratamiento con SERM altera el perfil lipídico de los pacientes, con especial mención de la concentración plasmática de cLDL. La unión de algunos SERM a AEBS produce la inhibición de las enzimas integrantes de este complejo y la acumulación de zimosterol, sustrato de D8D7, y 7-deshidrocolesterol, sustrato de DHCR7. Sin embargo, los SERM tienen efectos sobre la biosíntesis de colesterol que son independientes de este complejo. Así, el TAM [174] y el 4-OH-TAM [155] también inhiben a la 3β -hidroxiestero- Δ^{24} -reductasa (DHCR24) y, por tanto, producen la acumulación de desmosterol, y el RAL inhibe a D8D7 y a DHCR24, dando lugar a la acumulación principalmente de zimosterol [155]. Por su parte, se ha descrito que el TOR inhibe a D8D7 y causa la acumulación de Δ^8 -colestenol in vivo [173].

Además de su implicación en la biosíntesis de colesterol, el complejo AEBS posee actividad 5,6-epoxicolesterol hidrolasa (ECH), que cataliza la conversión de los diastereoisómeros $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolesterol y $5\beta,6\beta$ -epoxicolesterol, productos de la autoxidación del colesterol, en $3\beta,5\alpha,6\beta$ -colestanoetriol [175]. Se ha comprobado que la ECH tiene propiedades bioquímicas y farmacológicas similares a AEBS, lo que ha permitido establecer la identidad molecular entre ambas. Así, la interacción de AEBS con sus ligandos produce la acumulación intracelular de los anteriormente indicados precursores del colesterol debido a la inhibición no competitiva de las enzimas colesterogénicas incluidas en AEBS y, además, la acumulación de 5,6-epoxicolesterol (5,6-EC) por inhibición competitiva de la actividad ECH [176].

Algunas especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen la producción de distintos oxiesteroles, entre los que se encuentra el 5,6-EC, uno de los mayores productos de la autoxidación del colesterol. Se ha observado que los SERM estimulan la producción de ROS en distintas líneas celulares [177]. Por lo tanto, la acumulación de 5,6-EC por efecto de los SERM se produce tanto a través de la inhibición de ECH como de la generación de ROS. Se ha observado que el $3\beta,5\alpha,6\beta$ -colestanoetriol, producto de la ECH, está implicado en carcinogénesis, por lo que la inhibición de la formación de este compuesto puede contribuir a la acción quimioprotectora de los SERM [156].

Se ha descrito que el $5\alpha,6\alpha$ -EC es ligando de LXR, actuando como agonista o antagonista según el contexto celular y genético [178], por lo que los ligandos de AEBS

pueden alterar la expresión de las dianas de LXR. Así, se ha descrito que el tratamiento de células MCF-7 con TAM reprime la expresión del mRNA de ABCA1 y SREBP-1c, mientras que aumenta la del mRNA de ABCG1 [179]. Una de las características de la diferenciación de las células de cáncer de mama inducida por los ligandos de AEBS es la estimulación de la biosíntesis de triglicéridos, la cual está bajo el control de LXR. Recientemente, se ha observado que el 5 α ,6 α -EC es responsable de la inducción de la biosíntesis de triglicéridos por el TAM mediante la modulación de LXR β [179]. Este mecanismo puede estar implicado en el aumento de los triglicéridos plasmáticos o el desarrollo de hígado graso observados con cierta frecuencia en pacientes tratados con TAM [180].

El TAM inhibe la esterificación del colesterol tanto en células normales como en células tumorales de mama a través de la inhibición de la enzima ACAT-1, de manera que previene la formación de macrófagos espumosos *in vitro* [181].

El TAM incrementa la expresión y actividad del rLDL. Por un lado, se ha descrito que, al igual que el 17 β -estradiol, dicho SERM estimula la transcripción mediante la unión de un complejo ER α /Sp1 a un elemento Sp1 del promotor [94]. Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado que el TAM incrementa la expresión y actividad del rLDL en la línea celular MOLT-4, la cual no expresa ER [43]. En estas células, el TAM bloquea el transporte intracelular del colesterol libre derivado de las LDL, el cual se acumula en el endosoma tardío/lisosoma. Ello impide que dicho colesterol alcance el retículo endoplásmico y, así, la retroregulación de la expresión del rLDL. Además, la estimulación de la actividad del rLDL por el TAM es sinérgica con la producida por la lovastatina [43]. Junto con la inhibición de la biosíntesis de colesterol, el incremento de la actividad del rLDL puede contribuir al efecto hipocolesterolemiante del TAM. No se conoce si otros SERM que también reducen la concentración de cLDL, como el RAL y el TOR, alteran el tráfico intracelular de colesterol y la actividad del receptor.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El tratamiento con TAM, RAL o TOR produce como efecto secundario la reducción de la concentración de cLDL, pero el mecanismo responsable no se ha establecido. En anteriores trabajos realizados en nuestro laboratorio con la línea celular MOLT-4 se observó que el TAM aumenta la actividad y expresión del rLDL mediante la inhibición de la represión ejercida por las LDL. Además, este efecto se incrementa en presencia de LOV, produciéndose una sinergia entre ambos fármacos. El mecanismo subyacente para dicha acción del TAM es la inhibición de la exportación del colesterol de las LDL desde los endosomas tardíos/lisomas [43].

Dado que las células proliferantes, como son las líneas celulares, requieren un mayor aporte de colesterol para la biosíntesis de membranas, las actividades del receptor de LDL y la biosíntesis de colesterol están aumentadas respecto a las células quiescentes. En el presente trabajo nos propusimos estudiar el efecto de los SERM y sus combinaciones con LOV sobre la actividad del rLDL en células primarias humanas, para lo cual escogimos como modelo los linfocitos de sangre periférica. Nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar el efecto del TAM, RAL y TOR sobre la actividad del rLDL en linfocitos primarios humanos y compararlo con el producido en las líneas de linfoblastos MOLT-4 y hepatocitos HepG2.
2. Determinar los efectos de las combinaciones de dichos SERM con LOV sobre la actividad del rLDL.
3. Averiguar los mecanismos implicados en el efecto de los SERM sobre la actividad del rLDL, incluyendo el posible papel de los receptores de estrógenos.
4. Averiguar la efectividad de los SERM en linfocitos deficientes en rLDL procedentes de individuos con hipercolesterolemia familiar.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Los linfocitos se aislaron de sangre periférica de individuos normolipémicos y de hipercolesterolémicos. Las células de las líneas MOLT-4 (linfocitos T procedentes de leucemia linfoblástica aguda humana; ATCC CRL 1582) y HepG2 (hepatocitos humanos; ATCC CRL 11997) se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EE.UU.).

El tamoxifeno (TAM), endoxifeno (END) e ICI 182,780 se obtuvieron de Tocris Bioscience. El raloxifeno (RAL) y toremifeno (TOR) fueron amablemente cedidos por *Lilly Research Laboratories* (Indianápolis, IN, EE.UU.) y Orion Pharma (Espoo, Finlandia), respectivamente. El 17β -estradiol (E2) fue de Sigma-Aldrich, la lovastatina (LOV) se obtuvo de Merck, Sharp & Dhome. El $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ acetato (53,3 mCi/mmol) fue de Perkin-Elmer y el $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ oleato (50 Ci/mmol) de Hartmann Analytic.

Los anticuerpos utilizados para *western blot* fueron los siguientes: policlonal de pollo anti-receptor de LDL, de Millipore-Chemicon; policlonal de conejo anti-SREBP-2, de Abcam; policlonal de conejo anti-ER α , policlonal de cabra anti- β -actina y policlonal de conejo anti-GAPDH, de Santa Cruz *Biotechnology*, estos dos últimos como controles de carga.

El Lymphoprep (densidad 1,077 g/ml) se adquirió de Nycomed Pharma. Los medios y aditivos utilizados para los cultivos celulares fueron los siguientes: RPMI 1640 con rojo fenol, de PAA GmbH; RPMI 1640 sin rojo fenol, DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), suero bovino fetal (SBF) no tratado o tratado con carbono/dextrano, estreptomomicina, penicilina, gentamicina, aminoácidos no esenciales y piruvato sódico, todos ellos de Gibco BRL. El tampón fosfato salino (PBS) fue de Biomérieux. El suero deficiente en lipoproteínas (LPDS) se aisló por ultracentrifugación del SBF (tratado o no con carbono/dextrano) a una densidad de 1,21 kg/l, obteniéndose una concentración final de colesterol menor de 0,3 $\mu\text{g/ml}$. Las LDL se aislaron mediante ultracentrifugación de suero humano (ver apartado 2.4). La tripsina, poli-D-lisina, filipina III y vitamina E se adquirieron de Sigma-Aldrich, y el perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3,3'-tetrametilindocarbocianina (DiI) se adquirió de Molecular Probes

Europe. Colorantes de May-Grünwald y Giemsa, de Merck, Sharp & Dhome. El resto de compuestos químicos fue de calidad para análisis.

Los tubos con heparina de litio fueron de Greiner Bio-One GmbH y el material de plástico para cultivos celulares, de Nunc o Costar.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Pacientes

Se estudiaron sujetos sanos normolipémicos (7 hombres y 12 mujeres; edad media 35 años, comprendidos entre los 28 y 58 años) y pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar (FH; 14 hombres y 14 mujeres, edad media 42 años, comprendidos entre los 14 y 64 años). Los pacientes FH se reclutaron en la Clínica de Lípidos de la Fundación Jiménez Díaz-IDC (Dres. Rodrigo Alonso y Pedro Mata) y en la Unidad de Nutrición Clínica y Obesidad (Dra. Clotilde Vázquez) y el Servicio de Pediatría (Dra. Milagros Alonso) del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Los criterios para el diagnóstico de la FH se basaron en los establecidos en el Programa Internacional de la O.M.S. MED-PED (*Make Early Diagnosis to Prevent Early Death*) para la hipercolesterolemia familiar [182]. Todos los pacientes recibían tratamiento hipolipemiante en el momento en el que se reclutaron para el estudio. Los pacientes con terapia hormonal sustitutiva fueron excluidos. En 17 de los 28 pacientes (8 hombres y 9 mujeres) incluidos en este grupo se pudo constatar la existencia de una mutación en el gen *LDLR* en heterocigosidad. Además, se estudiaron tres pacientes (1 hombre y 2 mujeres) FH homocigotos (edades 10, 31 y 46 años) diagnosticados previamente. Todos los sujetos del estudio fueron informados y dieron su consentimiento para participar en el mismo. El protocolo seguido estuvo acorde con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

El diagnóstico genético se realizó mediante el microarray de DNA Lipochip, versión 4 (Progenika, Derio, España) y secuenciación capilar usando PCR multiplex [183]. Las muestras negativas según estos análisis se analizaron para la presencia de variaciones en el número de copias usando una metodología PCR multiplex fluorescente cuantitativa adaptada según se ha descrito anteriormente [183].

3.2.2. Aislamiento y cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica

Se aislaron las células mononucleadas (PBMC) a partir de sangre periférica de los sujetos en ayunas y extraída, habitualmente, en 3 tubos de 10 ml que contenían heparina de litio. Para el aislamiento se siguió el método de Boyum [184] y Gutiérrez et al [185]. La sangre se diluyó 1:2 con PBS, pH 7,4, se añadió sobre Lymphoprep y se centrifugó a 800 x g durante 40 minutos. Posteriormente, se recogió la interfase, se lavó tres veces con PBS y las PBMC se resuspendieron finalmente en medio RPMI 1640 suplementado con SBF al 1 % inactivado con calor, más 100 U/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina y 10 µg/ml de gentamicina. A continuación, las PBMC se incubaron durante 2 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % para permitir la adhesión de los monocitos al plástico del frasco de cultivo. Las células no adheridas (linfocitos) se recogieron y se resuspendieron en el medio anterior, pero suplementado esta vez con LPDS al 10%, en lugar de SBF, y se incubaron durante 72 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % para conseguir la expresión máxima del rLDL [186]. En los experimentos en los que se estudió el efecto de ICI 182,780, E2 o END (ver apartado 3.2.5), los linfocitos se incubaron en RPMI 1640 sin rojo fenol y con LPDS al 10 % obtenido a partir de SBF tratado con carbono/dextrano. La viabilidad celular fue del 87-92 %, determinada mediante el test de exclusión de azul trypano, y los distintos tratamientos no la alteraron significativamente.

3.2.3. Cultivo de las líneas celulares

Las células MOLT-4 se mantuvieron en RPMI 1640 y las HepG2 en DMEM, ambos medios suplementados con SBF al 10 % y los aditivos arriba mencionados para los linfocitos. Para los experimentos, las células se preincubaron en LPDS al 10 % durante 24 h para estimular la expresión del rLDL.

3.2.4. Aislamiento y marcaje de LDL

Las LDL se aislaron a partir de la fracción retenida en las columnas de sulfato de dextrano del sistema de aféresis de LDL del suero de un paciente con FH homocigótica. Dicha fracción se sometió a ultracentrifugación en gradiente de densidad en rotor vertical VTI 50, (Beckman) para eliminar otras lipoproteínas que pudiera contener [187]. Las LDL así obtenidas en la banda intermedia se dializaron exhaustivamente frente a NaCl 0,15 M con EDTA.Na₂ 1 mM, pH 7,4, durante 24 h, y posteriormente se esterilizaron por filtración (0,45 µm) y se conservaron en sacarosa al

10 % a -80 °C. La concentración de colesterol se determinó enzimáticamente (Bradford) en un autoanalizador (Kone Instruments, Kemia Científica).

Parte de estas LDL se marcaron con el fluorocromo lipofílico DiI, que se incorpora de forma no covalente a la lipoproteína sin alterar la carga superficial de la partícula [188]. Para ello, se disolvieron 3 mg de DiI en 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) y de esta solución se añadió lo necesario a una solución de LDL en LPDS para conseguir una proporción final de 300 µg de DiI por cada miligramo de proteína de LDL. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 12 h en la oscuridad. Las LDL ya marcadas se repurificaron por ultracentrifugación en equilibrio de densidad ($d = 1,125$ g/ml) y se dializaron frente a NaCl 0,15 M, siendo finalmente esterilizadas por filtración.

3.2.5. Ensayos de la actividad del receptor de LDL

Los linfocitos ($0,5 \times 10^6$ células/ml), células MOLT-4 ($0,5 \times 10^6$ células/ml) y células HepG2 (confluencia del 80 %) preincubados en medio con LPDS como se ha indicado anteriormente (ver apartados 3.2.2 y 3.2.3), se cultivaron en sus respectivos medios con LPDS al 10 % y suplementados con 60 µg/ml de proteína de LDL marcadas con DiI (DiI-LDL) y los diferentes SERM, LOV, E2, END o ICI 182,780, según se indicará, disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO, concentración final 0,044 %) o con vehículo, según se indicará, y se incubaron a 37 °C durante diferentes tiempos.

Para la medida de la expresión del receptor activo, los linfocitos se trataron o no con 60 µg/ml de LDL en presencia o ausencia de los diferentes SERM y vitamina E (en etanol, concentración final 0,4 %) a 37 °C durante distintos tiempos, al término de los cuales los linfocitos se lavaron y resuspendieron en medio fresco conteniendo 30 µg/ml de DiI-LDL y se incubaron a 37 °C durante 2 h. La captación específica se calculó sustrayendo el valor no específico obtenido en presencia de un exceso de 30 veces de LDL no marcadas. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Al final de la incubación las células se lavaron y resuspendieron en PBS y se analizaron por citometría de flujo en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson), equipado con un láser de argón con una emisión a 488 nm. Los linfocitos se seleccionaron por tamaño y complejidad para excluir las células muertas y los restos celulares. De cada muestra se analizaron 10.000 células con amplificación logarítmica de su intensidad de

fluorescencia. Se estimó la mediana de la intensidad de fluorescencia (M.I.F.) tras sustraer la autofluorescencia obtenida en células incubadas en ausencia de DiI-LDL.

3.2.6. Determinación de la B_{max} de unión y captación de LDL por los linfocitos

Para determinar la funcionalidad del rLDL de los linfocitos de los distintos individuos, se tomaron $0,5 \times 10^6$ células/ml por condición de los linfocitos preincubados en LPDS al 10 % y se incubaron durante 2 h a 4 °C, para la cuantificación de la unión, o a 37 °C, para la cuantificación de la captación, con concentraciones crecientes de DiI-LDL. En ambos casos, también se determinaron las correspondientes actividades no específicas en presencia de un exceso de 30 veces de LDL no marcadas para cada concentración de DiI-LDL utilizada. A continuación, las células se lavaron y resuspendieron en 1 ml de PBS para proceder a su análisis por citometría de flujo tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.5. Las curvas de saturación de la unión y la captación de DiI-LDL (**figura 1**) se ajustaron de acuerdo a un modelo de un sitio de unión y se calcularon las correspondientes B_{max} mediante el programa Prism 4.00 (GraphPad Software). En cada bloque de ensayos se aislaron y analizaron los linfocitos de un mismo donante normolipémico como control interensayo al cual se refirieron los valores obtenidos para las distintas muestras.

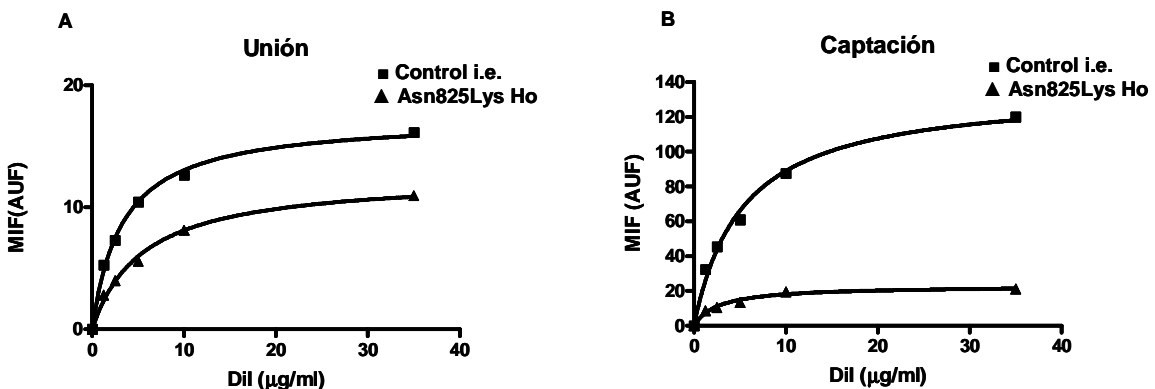


Figura 1. Ejemplos de curvas de saturación de la unión y captación de DiI-LDL para la determinación de los valores de B_{max} . Curvas de saturación de unión (A) y de captación (B) de DiI-LDL por linfocitos del control interensayo (i.e.) y de un paciente FH homocigoto para la mutación de clase 4 Asn825Lys (Asn825Lys Ho). Los linfocitos se incubaron con concentraciones crecientes de DiI-LDL durante 2 h a 4 °C (unión) o 37 °C (captación). MIF, mediana de la intensidad de fluorescencia; AUF, unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.2.7. Análisis del contenido y biosíntesis de colesterol

El contenido de esterol es se determinó a partir de un extracto de los lípidos de 12×10^6 células y análisis por espectrometría de masas-cromatografía de gases como se ha descrito anteriormente [40]. Una vez extraídos los esterol es con cloroformo/metanol 2:1 según el método de Folch [189], se disolvieron en tert-butilmetileter y posteriormente se derivatizaron con N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida/trimetilsililimidazol (9:1). A continuación, los esterol es se separaron y analizaron utilizando el equipo Agilent 6890 N GC acoplado al detector Agilent 5975 MS (Agilent Technologies) y con una columna DB-5ms, 30 m x 0,25 mm, con un grosor de 0,1 μm (Agilent Technologies). Como fase móvil se utilizó helio, a un flujo de 1 ml/min. El portal de inyección se mantuvo a 260 °C. La temperatura del horno se fijó a 55 °C durante 2 min, luego se incrementó hasta 260 °C a una tasa de 55 °C/min y, tras 10 min, se incrementó hasta 310 °C a razón de 7 °C/min. Para la cuantificación se utilizó un detector que monitorizaba tanto en modo de barrido completo como en modo SIM (*Selective Ion Monitoring*) analizando los iones característicos de cada esterol. Como estándar interno se utilizó 5 α -colestano. La identificación de los picos se realizó por comparación frente a patrones conocidos [40].

El estudio de la biosíntesis de esterol es se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los linfocitos y las células MOLT-4 (12×10^6 células/10 ml) se trataron con LPDS al 10 % suplementado o no con LOV 1 μM a 37 °C durante un total de 10 h. A las 2 h del inicio de estos tratamientos se añadieron al medio 40 μCi de [2-¹⁴C]acetato. Tras completarse los tratamientos, las células se centrifugaron, se lavaron con PBS y se trataron con 500 μl de KOH al 10 % para lissarlas. Los lípidos se extrajeron con cloroformo/metanol 2:1 y se separaron los lípidos no saponificables mediante saponificación con potasa etanólica y posterior extracción con hexano [189]. Una alícuota de esta última fracción se inyectó en el equipo de HPLC. El porcentaje de recuperación del proceso se determinó con sitosterol como estándar interno.

La separación cromatográfica se realizó con una columna de fase reversa Teknokroma mediterránea sea C18 (250 x 4,6 mm) 5 μm . Los lípidos se fluyeron con acetonitrilo-agua (95:3,5 v/v) durante los 37 primeros minutos y a continuación se prosiguió la elución con metanol absoluto, a un flujo de 1,2 ml/min. El efluente se monitorizó simultáneamente mediante luz ultravioleta (detector de onda variable

Beckman 168, Beckman Instrumens) y radiactividad (LB-506 C-1, Berthold). La identificación de los esteroides se realizó por comparación con los tiempos de retención de estándares puros y por análisis del espectro ultravioleta [40].

3.2.8. Determinación de la incorporación de [³H]oleato a los ésteres de colesterol

Las células ($12 \times 10^6/10$ ml) se incubaron en presencia de los SERM o vehículo durante 24 h. A las 2 h de iniciarse estos tratamientos se añadió una emulsión con 12 μ Ci de [9,10-³H]oleato y albúmina sérica humana al 0,15 %. Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS, se lisaron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 125 mM, NaF 5,3 mM, Na₄P₂O₇ 0,07 mM, Na₂.EDTA 1mM, Nonident P40 al 1 % y 5 μ l/ml de una mezcla de inhibidores de proteasas, (Calbiochem Protease Inhibitor Cocktail Set III), durante 30 minutos a 4 °C, seguido de sonicación y se procedió a la extracción de los lípidos con cloroformo-metanol 2:1. En una alícuota del lisado se determinó la concentración de proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA Protein Assay Kit, Pierce) y utilizando un lector de placas SpectraFluor (Tecan). Los lípidos extraídos se secaron, se resuspendieron en 100 μ l de cloroformo y se separaron mediante cromatografía en capa fina en una placa TCL Silica Gel F254 (Millipore), utilizando como fase móvil hexano-éter dietílico-ácido acético (90:30:1). Las bandas correspondientes a los ésteres de colesterol se recortaron, se sumergieron en líquido de centelleo y se contaron para determinar la incorporación de ³H.

3.2.9. Electroforesis e inmunodetección (western blot)

Una vez finalizados los tratamientos de las células ($12 \times 10^6/10$ ml), se lisaron, ver apartado 3.2.8. Seguidamente, el lisado se sonicó, se centrifugó y se recogió el sobrenadante, donde se valoró la concentración de proteína tal y como se describe en el apartado 3.2.8. Para la electroforesis, se utilizaron iguales cantidades de proteína (80-100 μ g) por muestra y aquella se realizó en condiciones reductoras y desnaturizantes en geles con SDS y gradiente de poliacrilamida al 7 y 10 % para el rLDL o poliacrilamida al 10 % para el resto de proteínas, siguiendo el método de Laemmli [190]. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein™ Dual color Standard (BioRad Laboratories). A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) durante toda la noche a 15 V y 4 °C. Seguidamente, se bloqueó con caseína al 0,1 % en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) durante 2 h a temperatura ambiente y se procedió a la inmunodetección

mediante la incubación con el anticuerpo primario correspondiente disuelto en TBS-Tween 20 al 0,1 % durante toda la noche a 4 °C, seguido del correspondiente anticuerpo secundario conjugado a IRDye® 800CW. Finalmente, las proteínas se visualizaron con un equipo Odyssey® Infrared Imaging System (LICOR). En algunos casos, la densidad óptica de las bandas se cuantificó con el programa Quantity One 4.5.2 y esta se normalizó por la del correspondiente control de carga.

3.2.10. Tinción de las células con filipina y microscopía de fluorescencia

Tras los tratamientos correspondientes, se depositaron 100 µl de cada suspensión de células sobre un cubreobjetos de 20 mm de diámetro que había sido tratado previamente con poli-D-lisina. Después, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS y se tiñeron con 25 µg/ml de filipina (Sigma) durante 1 h en la oscuridad. Después de lavar con PBS, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos en medio de montaje *ProLong Gold antifade reagent* (Life Technology Corporation) y las células se analizaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX51.

3.2.11. Tinción de las células con May-Grünwald Giemsa y microscopía óptica

Las células en esta ocasión se incubaron además de con los tratamientos habituales, con END, E2 y con las LDL sin marcar con DiI. Se recogieron 200 µl de cada suspensión de células que mediante citocentrífugación (Cytospin 3 Shandon) se depositaron sobre un portaobjetos. Posteriormente se fijaron y se tiñeron con May-Grünwald Giemsa (Merck). Las células se analizaron con un microscopio óptico Olympus BX51.

3.2.12. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR

El RNA total celular se extrajo mediante guanidinio-fenol-cloroformo-tiocianato utilizando TRI Reagent™ (Sigma). Se recogieron 12×10^6 de células por condición, se centrifugaron, se resuspendieron en 1 ml de TRI Reagent™ y se mantuvieron a -80 °C durante 1 h. A continuación, se añadieron 200 µl de cloroformo, se mezcló, se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente y se centrifugaron las muestras a 12.000 x g, durante 15 min, a 4 °C. Seguidamente, se extrajo la fase acuosa superior y se mezcló con 500 µl de isopropanol por cada ml de TRI Reagent™, se dejó reposar durante 10 min y se centrifugó a 12.000 x g, durante 10 min, a 4 °C,

descartándose el sobrenadante. El precipitado se disolvió en 1 ml de etanol al 75 %, se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min y el nuevo precipitado se disolvió en agua DEPC a 65 °C durante 15 min. Una vez aislado el RNA, su concentración se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop y se comprobó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %.

En la reacción de retrotranscripción para la obtención del cDNA se utilizaron 500 ng de RNA total y se siguió el protocolo del kit Primer Script RT Reagent (Takara), en un volumen final de 10 µl con Oligo dT 25 pmol, cebadores aleatorios 50 pmol y 0,5 µl de la solución con la enzima. La reacción se llevó a cabo mediante una incubación de 15 min a 37 °C y una inactivación de 5 segundos a 85 °C.

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se realizó con el kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) en un termociclador LightCycler® 480 II, siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando cebadores específicos para cada mRNA (**tabla 1**). Cada muestra se amplificó por duplicado. El cDNA se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min y se realizaron 45 ciclos de amplificación a 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 15 segundos. Por último, se realizó un ciclo a 95 °C durante 5 segundos y 65 °C durante 1 min para determinar las curvas de disociación. La cuantificación de la expresión relativa del gen se realizó con el programa LightCycler® 480 SW 1.5 (Roche), calculando el incremento de CP (ΔCP) corregido por la eficiencia para los cebadores y normalizado por el control invariable *RPLP0*.

Gen	ID Banco Genes	Primer	Secuencia 5'→3'
ABCA1	NM_005502.3	ABCA1 Fw	GCACTGAGGAAGATGCTGAAA
		ABCA1 Rev	AGTTCCTGGAAGGTCTTGTTCCAC
FASN	NM_004104.4	FASN Fw	TACGTA CTGGCCTACACCCAGA
		FASN Rev	TGAACTGCTGCACGAAGAAGCATAT
HMGR	BC033692	HMGR Fw	GGACCCCTTTGCTTAGATGAAA
		HMGR Rev	CCACCAAGACCTATTGCTCTG
LDLR	NG_009060	LDLR Fw	GCGAAGATGCGAAGATATCGATG
		LDLR Rev	CCGGTTGGTGAAGAAGAGGTAG
RPLP0	BC000087	RPLP0 Fw	CCTCATATCCGGGGGAATGTG
		RPLP0 Rev	GCAGCAGCTGGCACCTTATTG
SREBF1	NM_004176.4	SREBF1 Fw	GCAAGGCCATCGACTACATTC
		SREBF1 Rev	GACAGCAGTGCGCAGACTTA
SREBF2	NM_004599	SREBF2 Fw	CTCACCTTCCTGTGCCTCTC
		SREBF2 Rev	AGGCATCATCCAGTCAAACC

Tabla 1. Primers para RT-PCR cuantitativa a tiempo real

3.2.13. Análisis estadístico

El efecto de los SERM se analizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para medidas repetidas (MR). Para los resultados con distintas dosis o tiempos, los efectos principales y las interacciones se analizaron mediante ANOVA de dos vías para MR. Del mismo modo, para evaluar la interacción de los SERM con otros fármacos o con grupos de pacientes se utilizó el ANOVA de dos vías para MR. La comparación entre los diferentes grupos de pacientes se realizó con un ANOVA de una vía. Las posteriores comparaciones múltiples se realizaron mediante el test de Student-Newman-Keuls. Para estos análisis se utilizó el programa SigmaStat 2.0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LOS SERM SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE LDL EN LINFOCITOS HUMANOS

Comenzamos este estudio por la caracterización del efecto del TAM, RAL y TOR sobre la actividad del rLDL. Para ello, utilizamos linfocitos aislados de sangre periférica de hombres normolipémicos.

4.1.1. Efecto de la dosis y el tiempo de tratamiento con los SERM sobre la actividad del receptor de LDL

En primer lugar, analizamos el efecto de diferentes dosis de los tres SERM sobre la captación de DiI-LDL, para lo cual empleamos concentraciones (hasta 10 μM) en el rango de las alcanzables terapéuticamente tomando como referencia lo publicado para el caso del tratamiento con TAM [191]. Así, a los medios de incubación se añadieron o no (control) dosis crecientes de los tres SERM y, en todos los casos, una concentración saturante de DiI-LDL (60 $\mu\text{g/ml}$). Las células se incubaron en estas condiciones durante 24 h, al término de las cuales se midió la captación de DiI-LDL mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **figura 2**, los tres SERM estimularon significativamente la captación de DiI-LDL de forma dependiente de la dosis. El TAM mostró el mayor efecto seguido del TOR, mientras que el RAL apenas si tuvo efecto por debajo de la concentración de 5 μM . Para los estudios sucesivos escogimos la dosis de 5 μM .

A continuación, estudiamos el efecto del tiempo de tratamiento con los SERM sobre la captación de DiI-LDL. Los linfocitos se trataron con los SERM a una concentración 5 μM o vehículo, y en presencia de DiI-LDL (60 $\mu\text{g/ml}$) durante 8, 24 o 48 h. Los tres SERM incrementaron la captación de DiI-LDL con el tiempo de tratamiento (**figura 3**). El TAM volvió a ser el más efectivo, mientras que el efecto del RAL fue nimio, no siendo en este caso significativamente diferente de la condición control (**figura 3**). Por lo tanto, el TAM, TOR y RAL incrementaron, por este orden, la captación de DiI-LDL por linfocitos primarios de manera dependiente de la dosis y el tiempo de tratamiento.

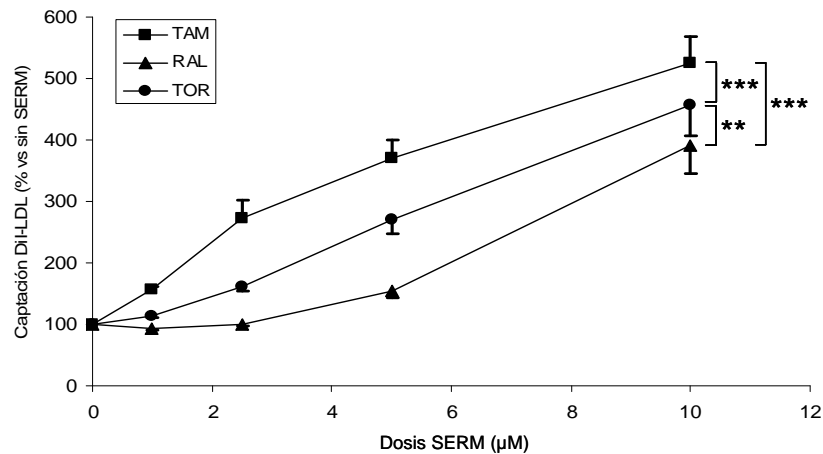


Figura 2. Efecto de la dosis de TAM, RAL y TOR sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos de hombres normolipémicos. Los linfocitos de 5 hombres se incubaron con 60 µg/ml DiI-LDL más vehículo (control) o concentraciones crecientes de TAM, RAL o TOR durante 24 h. Los resultados (media ± error estándar) están expresados como porcentaje del control de la misma preparación de linfocitos. Los efectos de los SERM se compararon mediante ANOVA de dos vías para medidas repetidas y, después, mediante el método de Student–Newman-Keuls. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

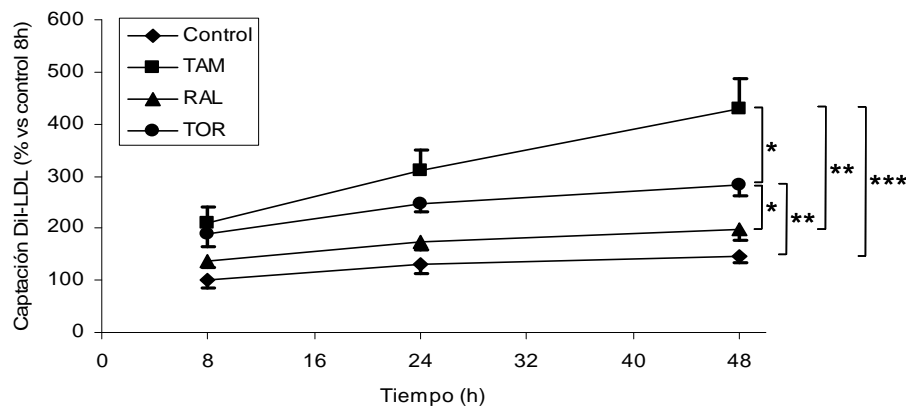


Figura 3. Efecto del tiempo de tratamiento con TAM, RAL y TOR sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos de hombres normolipémicos. Los linfocitos de 5 hombres se incubaron con 60 µg/ml de DiI-LDL más vehículo (control) o una concentración 5 µM de TAM, RAL o TOR, durante 8 h, 24 h o 48 h. Los resultados (media ± error estándar) están expresados como porcentaje del control de 8 h de la misma preparación de linfocitos. Los efectos de los tratamientos se compararon mediante ANOVA de dos vías para medidas repetidas y, después, mediante el método de Student–Newman-Keuls. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Dado el efecto de los SERM sobre la captación de DiI-LDL por linfocitos procedentes de hombres, quisimos averiguar si este efecto también se producía en linfocitos de mujeres. Para ello, incubamos linfocitos de mujeres normolipémicas en

presencia de los SERM a una concentración 5 μM o vehículo durante 24 h para medir la captación de DiI-LDL como anteriormente. Encontramos que el efecto de cada SERM era equivalente al observado en los linfocitos de hombres en esas mismas condiciones (figura 4).

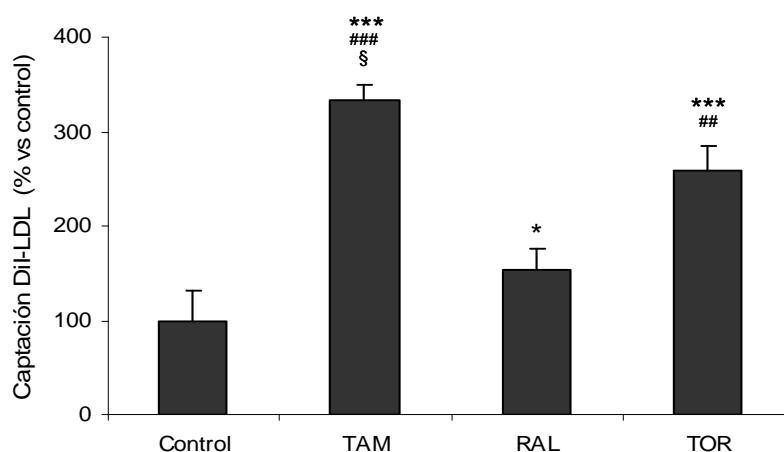


Figura 4. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos de mujeres normolipémicas. Los linfocitos procedentes de 5 mujeres normolipémicas se incubaron con 60 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL más vehículo (control) o una concentración 5 μM de TAM, RAL o TOR, durante 24 h. Los resultados (media \pm error estándar) se expresan como porcentaje del control de la misma preparación de linfocitos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía para medidas repetidas y, después, mediante el método de Student-Newman-Keuls. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs control; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ vs RAL; § $P < 0,05$ vs TOR.

4.1.2. Efecto de los SERM sobre la expresión del receptor de LDL

Para el estudio del efecto de los SERM sobre la expresión del rLDL se realizaron dos aproximaciones distintas. En la primera, los linfocitos se trataron con LDL en presencia o ausencia de SERM 5 μM , o bien con LPDS sin suplementar, condición utilizada como referencia, durante 6, 22 o 46 h. Al finalizar cada periodo de tiempo, se reemplazó el medio por otro conteniendo DiI-LDL y se incubó durante 2 h. Se midió posteriormente la captación específica de las DiI-LDL, la cual refleja la cantidad de rLDL activo al final de los tratamientos [43]. Como se muestra en la **figura 5**, la presencia de LDL solas en el medio causó un descenso progresivo de la captación de DiI-LDL respecto a la condición con LPDS sin suplementar, lo que está de acuerdo con la conocida inhibición de la expresión del rLDL por la adición de colesterol al medio. El tratamiento con cualquiera de los SERM se opuso significativamente a la represión ejercida por las LDL a lo largo del tiempo estudiado, obteniéndose curvas

paralelas a las de las células no tratadas con fármaco. El TAM fue el que más se opuso al efecto de las LDL, seguido por el TOR (**figura 5**).

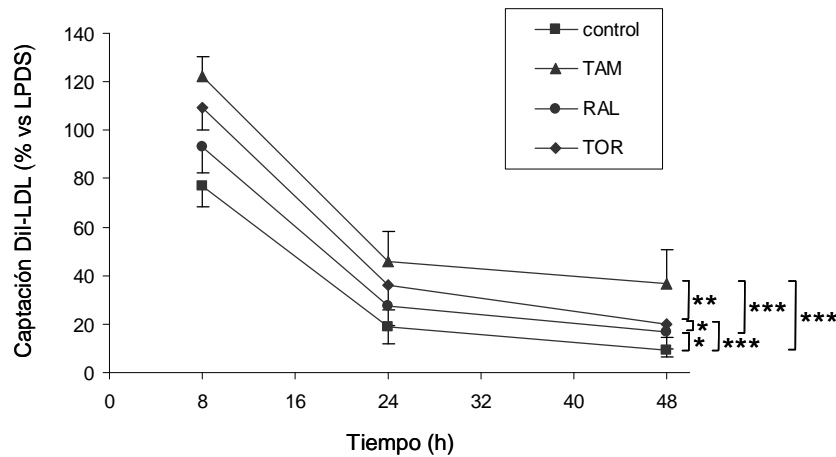


Figura 5. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la expresión del rLDL activo. Los linfocitos de 4 hombres se incubaron en LPDS al 10 % solo o suplementado con 60 $\mu\text{g/ml}$ LDL más vehículo (control) o una concentración 5 μM de TAM, RAL o TOR, durante 6 h, 22 h o 46 h. Al finalizar los tratamientos, se reemplazó el medio por otro conteniendo 30 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL y las células se incubaron durante 2 h más. Posteriormente, se midió la captación específica de DiI-LDL que fue calculada por sustracción del valor inespecífico obtenido en presencia de 30 veces más de LDL sin marcar. Los resultados (media \pm error estándar) están expresados como porcentaje de la condición con LPDS de cada tiempo y de la misma preparación de linfocitos. La captación de DiI-LDL con LPDS a las 8, 24 y 48 h fue $17,7 \pm 4,7$; $21,3 \pm 4,7$ y $24,1 \pm 5,4$ unidades arbitrarias de fluorescencia, respectivamente. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías para medidas repetidas y, después, mediante el método Student-Newman-Keuls. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

En la segunda aproximación, analizamos el efecto de los SERM sobre la cantidad de proteína del rLDL por *western blot*. Los resultados mostraron una progresiva disminución de la cantidad de proteína con el tiempo de tratamiento con LDL respecto a la condición con LPDS solo (**figura 6**). Nuevamente, los SERM se opusieron a dicho efecto, siendo el TAM más efectivo que el TOR y el RAL (**figura 6**). Estos resultados coinciden con los obtenidos midiendo la captación de DiI-LDL en las 2 h posteriores al tratamiento mostrados anteriormente, y todos ellos en conjunto indican que el efecto de los SERM sobre la actividad del receptor radica en un aumento de la expresión de este.

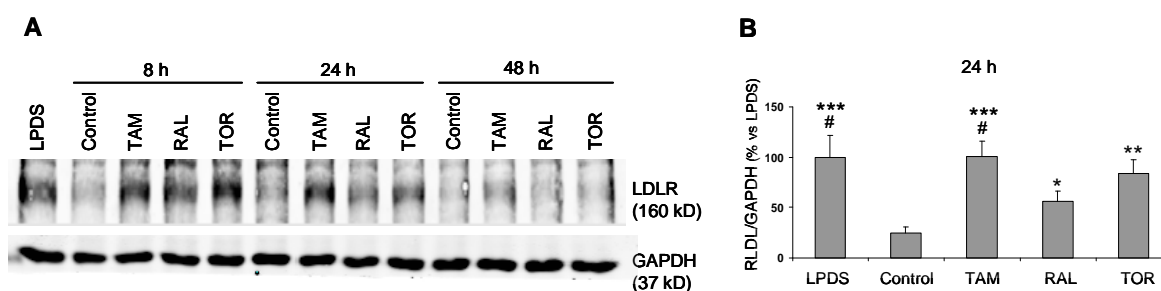


Figura 6. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la expresión del rLDL mediante *western blot*. **A.** *Western blot* de los linfocitos de un hombre tras el tratamiento con LPDS al 10 % solo o suplementado con 60 µg/ml de LDL más vehículo (control) o una concentración 5 µM de TAM, RAL o TOR durante 8 h, 24 h o 48 h, al término de las cuales las células se lisaron y 80 µg de proteína se sometieron a SDS/PAGE para la inmunodetección del rLDL o GAPDH como control de carga. **B.** Se representa la media ± error estándar, de la densidad de las bandas del rLDL normalizada por la de las correspondientes bandas de GAPDH de los linfocitos de 4 hombres después de 24 h de tratamiento. Los resultados están expresados como porcentaje de la condición con LPDS. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía para mediadas repetidas y, después, mediante el test de Student-Newman-Keuls. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs control; # $P < 0,05$ vs RAL.

Se ha descrito que el TAM aumenta la expresión del gen *LDLR* a través de un mecanismo en el que están implicados la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inhibición de la 5,6-epoxicolesterol hidrolasa, efecto aquel que es bloqueado por la vitamina E [179]. Quisimos estudiar el efecto de distintas concentraciones de vitamina E, hasta 500 µM, sobre la cantidad de rLDL activo en presencia o ausencia de los SERM. Concentraciones crecientes de vitamina E mostraron una tendencia a reducir el efecto de los SERM (**figura 7**), aunque esta no fue estadísticamente significativa ($P = 0,104$). Cuando analizamos el efecto de cada una de las dosis de vitamina E empleadas, encontramos que solo la concentración suprafisiológica de 250 µM interaccionó significativamente con los SERM ($P = 0,036$). Esta dosis de vitamina E disminuyó el efecto del RAL ($P = 0,003$), pero no el del TAM o el TOR.

4.1.3. Efecto de los SERM sobre el contenido celular y la biosíntesis de colesterol

Nos propusimos determinar el contenido de esteroides de los linfocitos. La adición de LDL incrementó el contenido de colesterol celular con respecto a la condición con LPDS solo (**figura 8**). El tratamiento con cualquiera de los tres SERM aumentó más el contenido celular de colesterol, aunque moderadamente, y las diferencias no alcanzaron significación estadística respecto a la condición con LDL solas (**figura 8**).

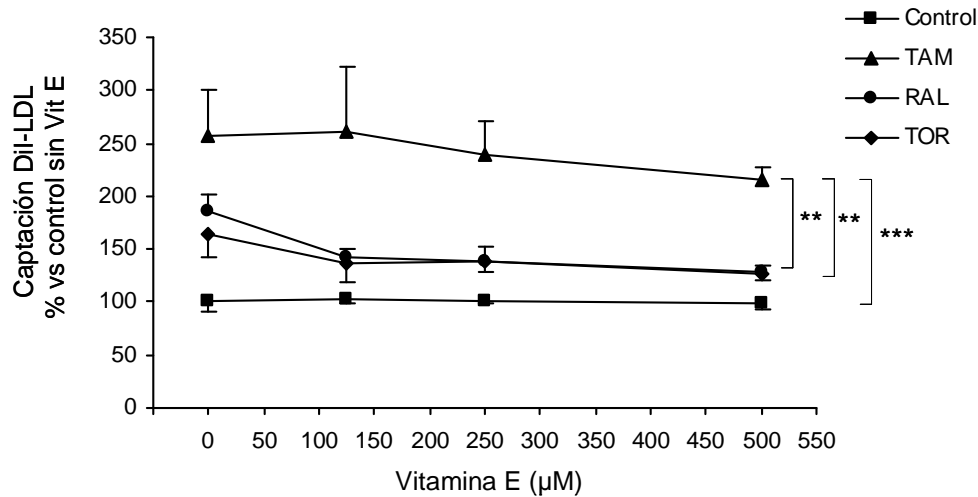


Figura 7. Efecto de la vitamina E sobre la estimulación de la expresión del rLDL activa inducida por el TAM, RAL y TOR. Los linfocitos de 4 hombres se trataron con 60 µg/ml LDL más vehículo (control) o una concentración 5µM de TAM, RAL o TOR y combinados o no con diferentes concentraciones de vitamina E durante 22 h. Al finalizar este tiempo, se reemplazó el medio por otro conteniendo 30 µg/ml DiI-LDL y las células se incubaron durante 2 h más. Posteriormente, se midió la captación de DiI-LDL. Los resultados (media ± error estándar) están expresados como porcentaje de la condición con solo LDL y de la misma preparación de linfocitos. El efecto de los distintos tratamientos se comparó mediante ANOVA de dos vías para medidas repetidas y, después, mediante el método Student-Newman-Keuls. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

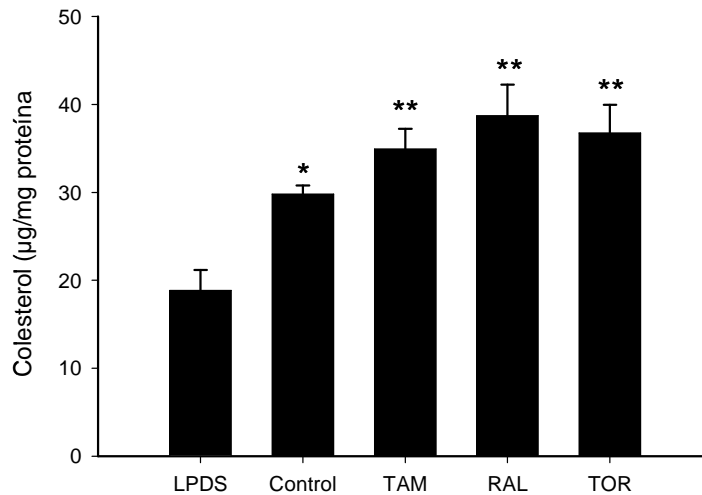


Figura 8. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre el contenido de colesterol de los linfocitos. Los linfocitos de 5 hombres se trataron con LPDS al 10 % solo o suplementado con 60 µg/ml LDL más vehículo (control) o una concentración 5 µM de TAM, RAL o TOR durante 24 h. Los resultados (media ± error estándar) están expresados en µg/mg de proteína. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía para medidas repetidas y, después, mediante el test de Student-Newman-Keuls. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs LPDS

Por otro lado, en ninguna de las condiciones se pudieron detectar esteroides precursores del colesterol, lo cual sugiere una escasa tasa de biosíntesis de colesterol en

los linfocitos primarios. De hecho, cuando se analizó la biosíntesis de colesterol mediante la incorporación de [^{14}C]acetato en los linfocitos incubados en LPDS, condición que produce una máxima estimulación de dicha vía, la biosíntesis de colesterol fue prácticamente indetectable, de manera bien distinta a la de las células MOLT-4 incubadas en las mismas condiciones (**figura 9**). Así, el tratamiento con lovastatina (LOV), inhibidor de la HMG-CoA reductasa, redujo drásticamente la biosíntesis de colesterol en estas células, mientras que en los linfocitos no produjo ningún cambio (**figura 9**).

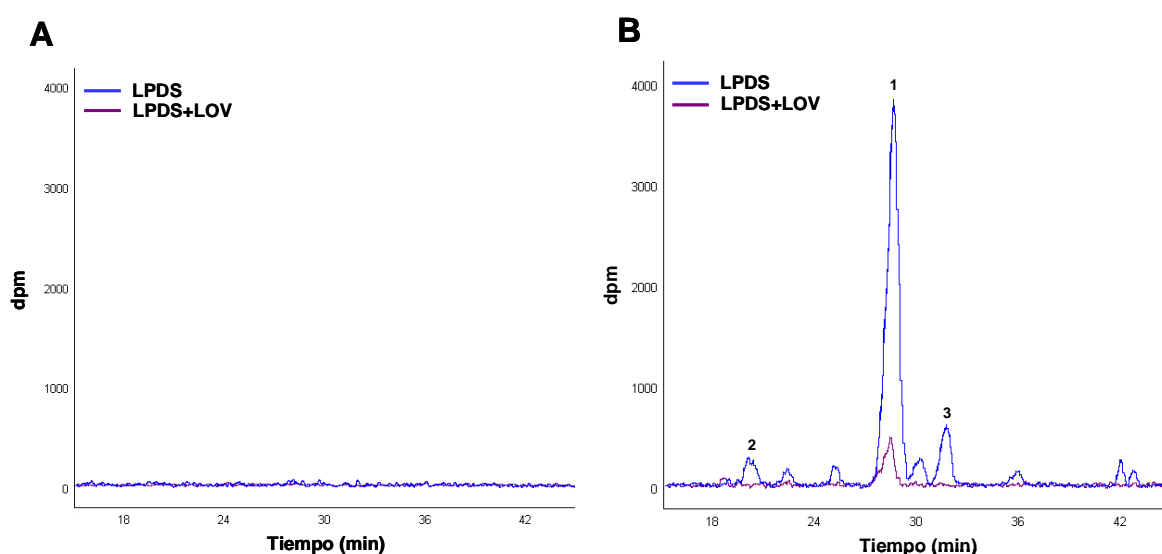


Figura 9. Biosíntesis de colesterol en los linfocitos primarios y células MOLT-4. Los linfocitos primarios (A) y las células MOLT-4 (B) se incubaron en LPDS en ausencia o presencia de LOV $1\mu\text{M}$ durante 10 h. A las 2 h de incubación se añadió [^{14}C]acetato. Se analizó el perfil de los lípidos no saponificables mediante HPLC y se midió la incorporación de ^{14}C a colesterol. Pico 1, colesterol; pico 2, desmosterol; pico 3, lanosterol.

4.1.4. Efecto de los SERM sobre la distribución intracelular del colesterol libre

Nuestro grupo ha descrito que el TAM causa la acumulación del colesterol libre procedente de las LDL en los endosomas/lisomas de las líneas celulares MOLT-4 y HepG2, efecto que se ve incrementado por el tratamiento simultáneo con lovastatina (LOV) [43]. Para averiguar el efecto de los tres SERM y sus combinaciones con lovastatina sobre la distribución del colesterol libre en los linfocitos primarios, incubamos las células con DiI-LDL en presencia o ausencia de estos fármacos, tras lo cual las teñimos con filipina, que se une al colesterol libre, y las analizamos por microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la **figura 10**, las células tratadas con

cualquiera de los SERM presentaron gránulos periféricos con intensa fluorescencia, que indica la acumulación de colesterol libre. Además, la localización de estos gránulos coincidió con la del fluorocromo DiI (**figura 10**), indicando que el colesterol acumulado deriva de las LDL captadas por los linfocitos. La adición de LOV no produjo ningún cambio apreciable sobre estos efectos de los SERM (**figura 11**).

Para observar con mayor detalle el aspecto del citoplasma de los linfocitos, las células se tiñeron mediante la técnica de May-Grünwald Giemsa, en este caso tras la incubación con LDL sin marcar con DiI. En la **figura 12** puede observarse un aumento de la cantidad de gránulos periféricos no teñidos en las células tratadas con cualquiera de los SERM respecto a las células control. De nuevo, la adición de LOV a las células control o tratadas con SERM no produjo ningún cambio apreciable (**figura 13**). Estos cambios morfológicos se corresponden con los observados mediante la tinción con filipina y DiI (**figuras 10 y 11**), lo que sugiere que los gránulos citoplasmáticos acumulados por efecto de los SERM y puestos en evidencia con la tinción de May-Grünwald Giemsa corresponden a endosomas/lisosomas. Dado que, como se mostrará en los apartados 4.1.7. y 4.1.8, en este trabajo también estudiamos el efecto del tratamiento de los linfocitos con E2 y END, metabolito activo del TAM, sobre la actividad del rLDL los linfocitos también se trataron con estas moléculas para estudiar su morfología. El E2 no produjo alteraciones en el aspecto celular respecto al control, mientras que el END indujo la acumulación de gránulos citoplasmáticos (**figura 12**).

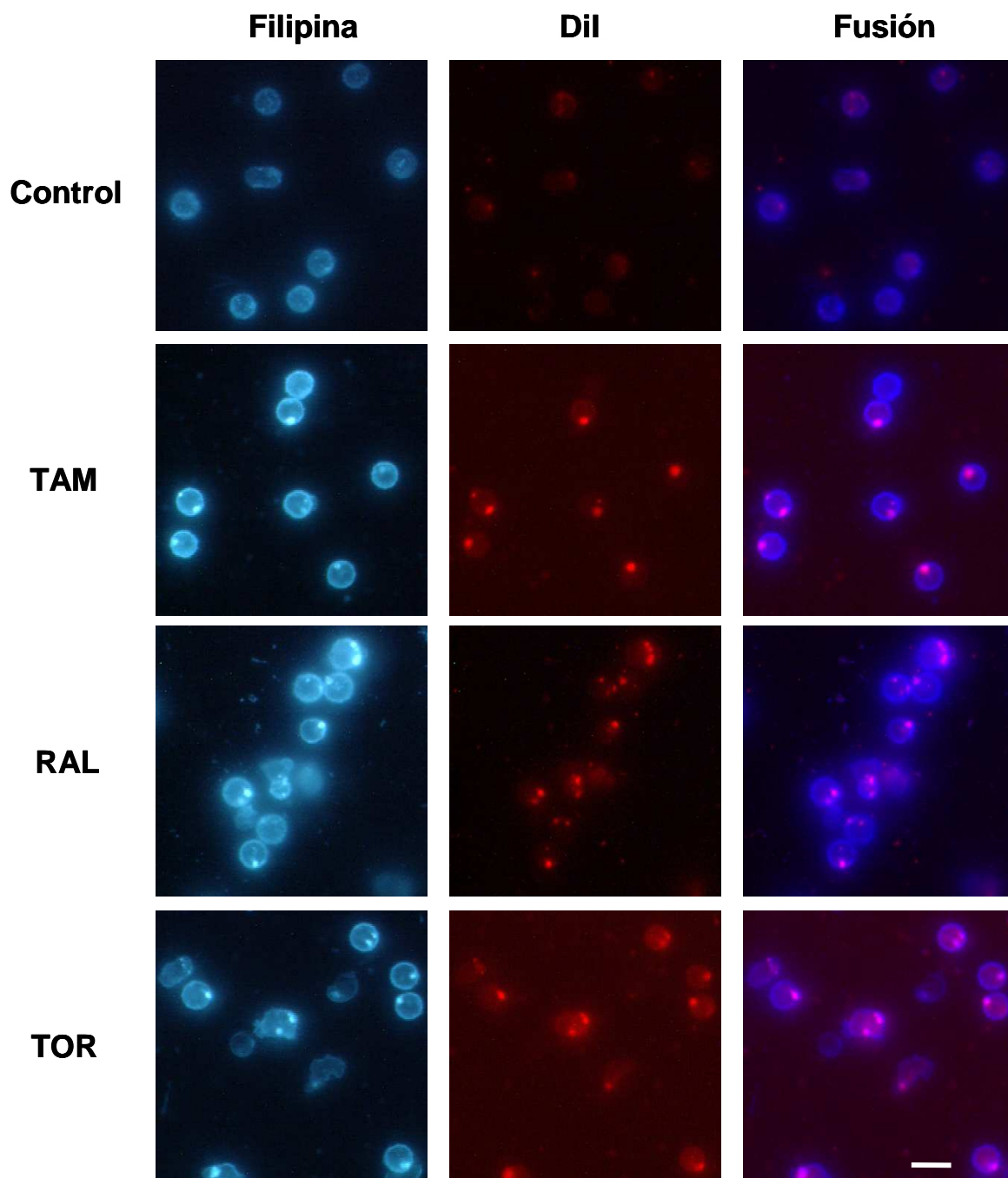


Figura 10. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la distribución intracelular del colesterol en los linfocitos. Los linfocitos se trataron con 60 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL más vehículo (control) o TAM, RAL o TOR a una concentración 5 μM durante 24 h. Posteriormente, las células se fijaron, se tiñeron con filipina y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. Las fotografías corresponden a los linfocitos de un individuo representativo de 3. Barra: 10 μM .

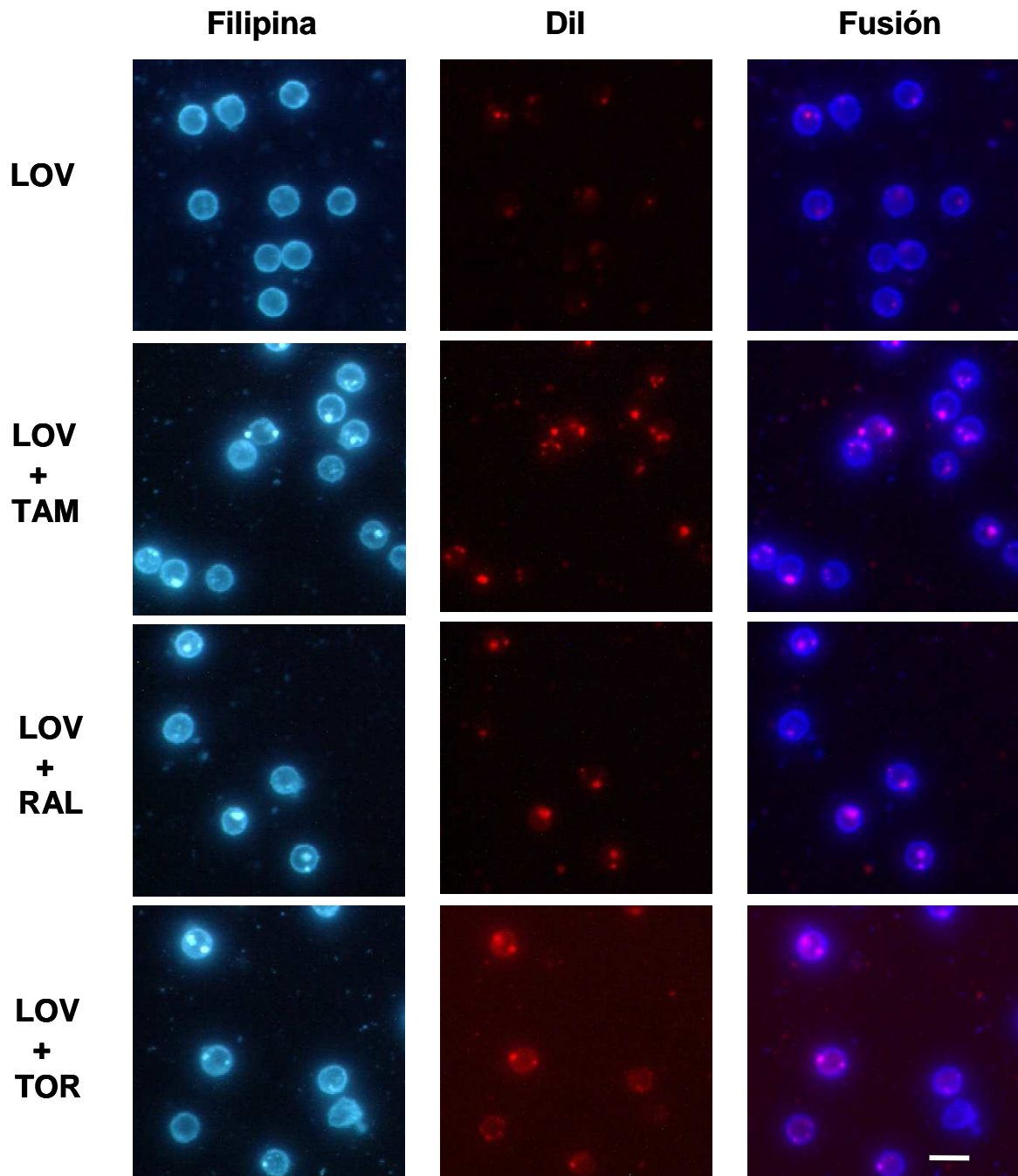


Figura 11. Efecto de la combinación de los SERM con lovastatina sobre la distribución intracelular del colesterol en los linfocitos. Los linfocitos se trataron con 60 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL más LOV 1 μM sola o combinada con TAM, RAL o TOR a una concentración 5 μM durante 24 h. Posteriormente, las células se fijaron, se tiñeron con filipina y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. Las fotografías corresponden a los linfocitos de un individuo representativo de 3. Barra: 10 μM .

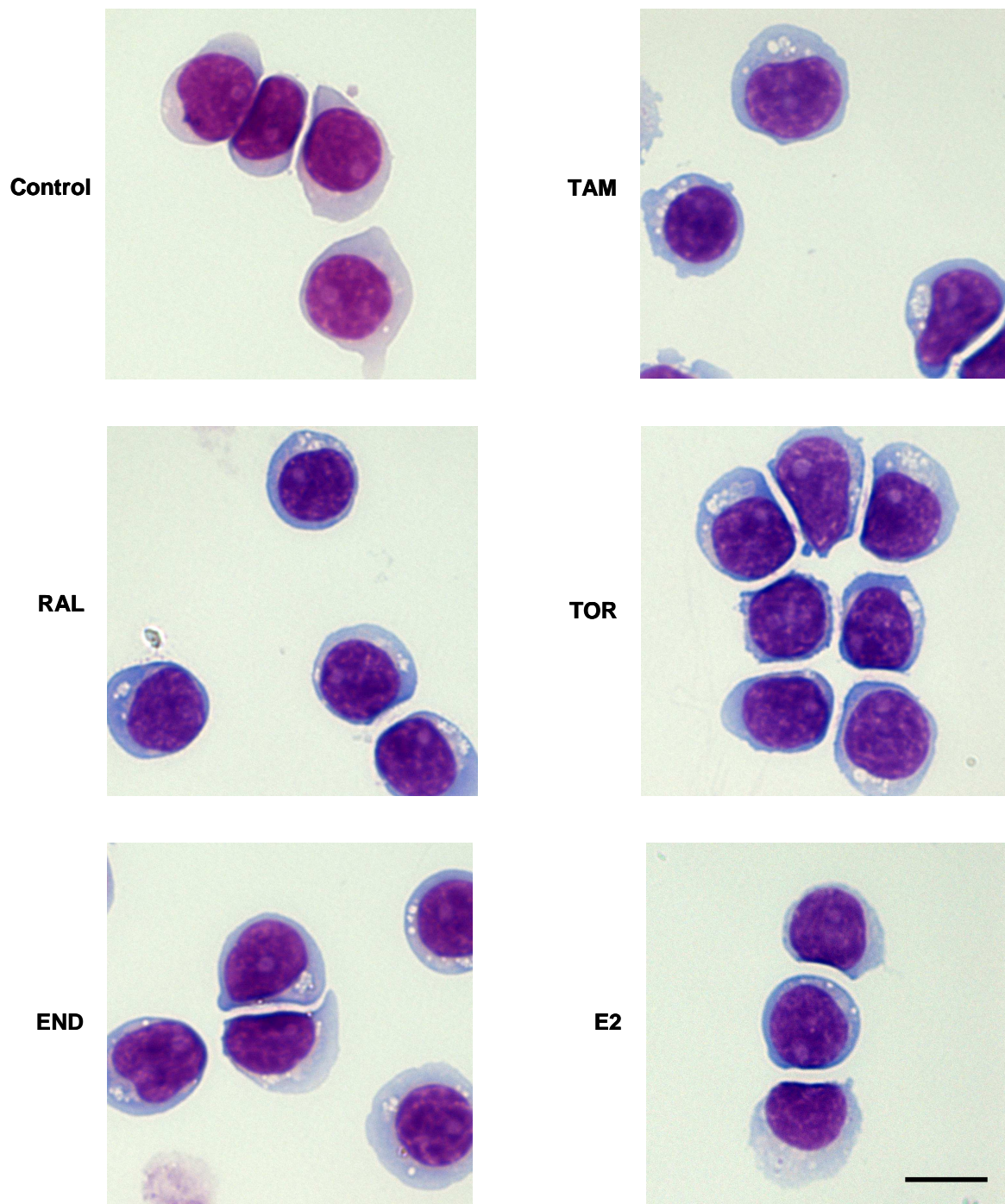


Figura 12. Efecto del TAM, RAL, TOR, END y E2 sobre la morfología de los linfocitos teñidos mediante la técnica de May-Grünwald Giemsa. Los linfocitos se trataron con 60 $\mu\text{g/ml}$ LDL más vehículo (control) o TAM, RAL, TOR o END a una concentración 5 μM , o E2 0,025 μM durante 24 h. Posteriormente, las células se fijaron, se tiñeron mediante la técnica de May-Grünwald Giemsa y se observaron mediante microscopía óptica. Las fotografías corresponden a los linfocitos de un individuo representativo de 3. Barra: 10 μM

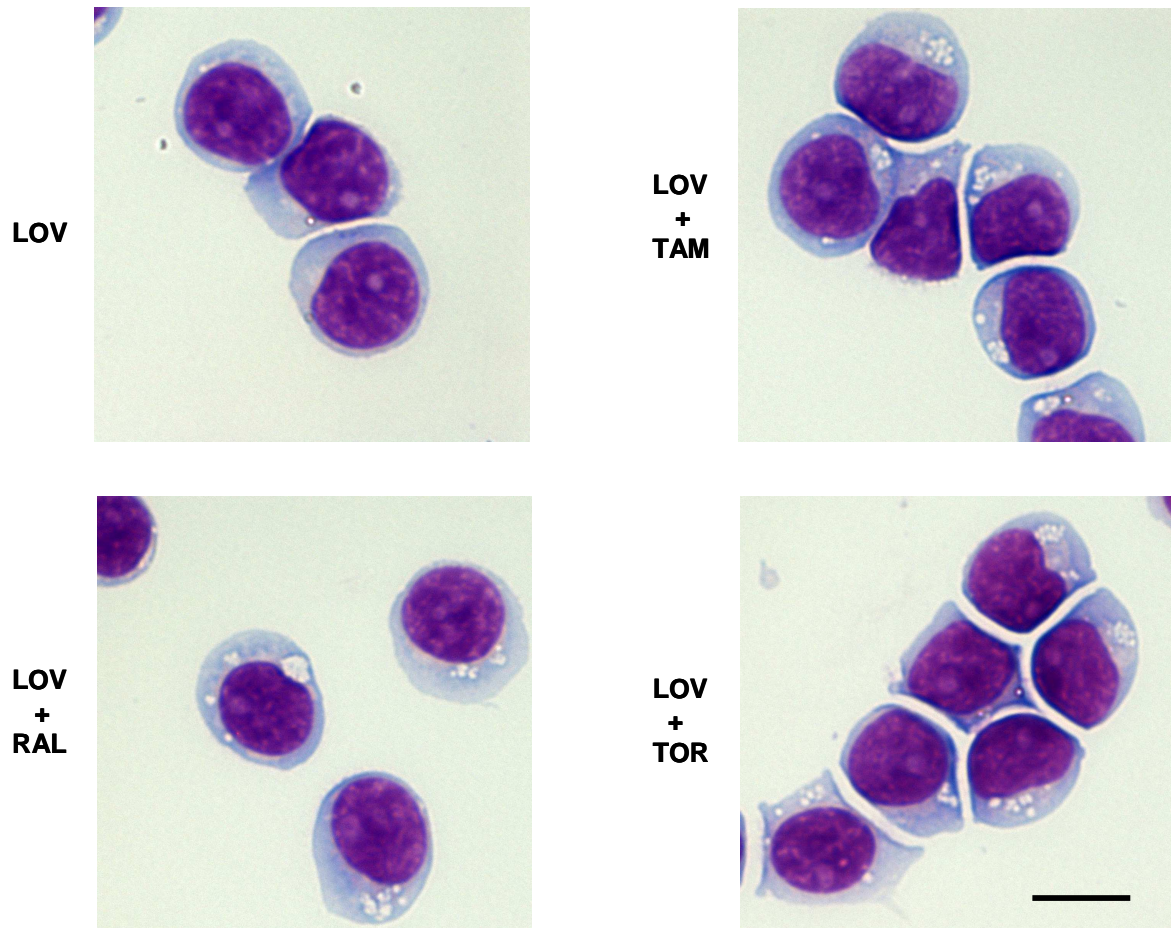


Figura 13. Efecto de la combinación de los SERM con lovastatina sobre la morfología de los linfocitos teñidos mediante la técnica de May-Grünwald Giemsa. Los linfocitos se trataron con 60 $\mu\text{g/ml}$ LDL más LOV 1 μM sola o combinada con TAM, RAL o TOR a una concentración 5 μM durante 24 h. Posteriormente, las células se fijaron, se tiñeron mediante la técnica de May-Grünwald Giemsa y se observaron mediante microscopía óptica. Las fotografías corresponden a linfocitos de un individuo representativo de 3.

En su conjunto, estos resultados sugieren que los SERM inducen la acumulación de endosomas/lisosomas e interfieren en la salida del colesterol de estos orgánulos en los linfocitos primarios, y que este efecto no es incrementado por la LOV.

4.1.5. Efecto de los SERM en la vía de SREBP y actividad de ACAT

La asociación del incremento de la expresión del rLDL con la acumulación del colesterol derivado de las LDL en los endosomas/lisosomas por efecto de los SERM nos indujo a medir la expresión de los genes diana de SREBP, la cual está controlada por la cantidad de colesterol que llega al retículo endoplásmico (ver apartado Introducción 1.4.4.1). Por ello, determinamos la expresión del mRNA de *LDLR* y otros genes diana

de SREBP-2 y SREBP-1, incluyendo *HMGCR*, *FASN*, *SREBF2* y *SREBF1* (que codifican la HMG-CoA reductasa, ácido graso sintasa, SREBP-2 y SREBP-1 respectivamente), en linfocitos tratados con LDL, LDL más SERM o solo LPDS durante 8 h. Como muestra la **figura 14**, las LDL reprimieron la expresión de *LDLR*, *HMGCR*, *FASN* y *SREBF2* en distinto grado respecto a la condición con LPDS. Los SERM se opusieron a dicha represión, siendo el RAL el más efectivo. Por el contrario, la expresión de *SREBF1* no fue reducida por las LDL ni alterada por los SERM (**figura 14**). Probablemente, esto es debido a la existencia de dos transcritos diferentes de este gen, que corresponden a SREBP-1a y SREBP-1c, respectivamente, y los cuales se regulan de manera distinta. Así, la expresión de SREBP-1c es estimulada por el receptor nuclear LXR, el cual es activado por oxisteroles en respuesta al aumento del contenido celular de colesterol [192]. Para comparar, medimos la expresión de *ABCA1*, que codifica el transportador de colesterol ABCA1, otra diana de LXR [192]. Distintamente a lo que sucedió, en general, con las dianas de los SREBP, las LDL solas estimularon la expresión de *ABCA1* 20 veces y los tres SERM atenuaron eficientemente dicho efecto (**figura 14**).

Para determinar si los cambios en la expresión de los genes diana de los SREBP estaban asociados a cambios en la cantidad de SREBP activo, analizamos la cantidad de la forma nuclear de SREBP-2 en el extracto nuclear de los linfocitos. Los tres SERM se opusieron a la reducción de la cantidad de SREBP-2 nuclear mediada por las LDL (**figura 15**). En su conjunto, estos resultados indican que los tres SERM promueven la activación de la vía de los SREBP en presencia de LDL.

Al igual que los SREBP, la enzima ACAT reside en el retículo endoplásmico, donde, en respuesta a un aumento en el contenido de colesterol, cataliza la esterificación de este con un ácido graso para su almacenamiento. Determinamos, por tanto, el efecto del tratamiento con los SERM durante 24 h sobre la actividad de la ACAT (ACAT-1) mediante la incorporación de ácido [³H]oleico a los ésteres de colesterol de los linfocitos. Como se muestra en la **tabla 2**, los tres SERM inhibieron significativamente la actividad de la ACAT.

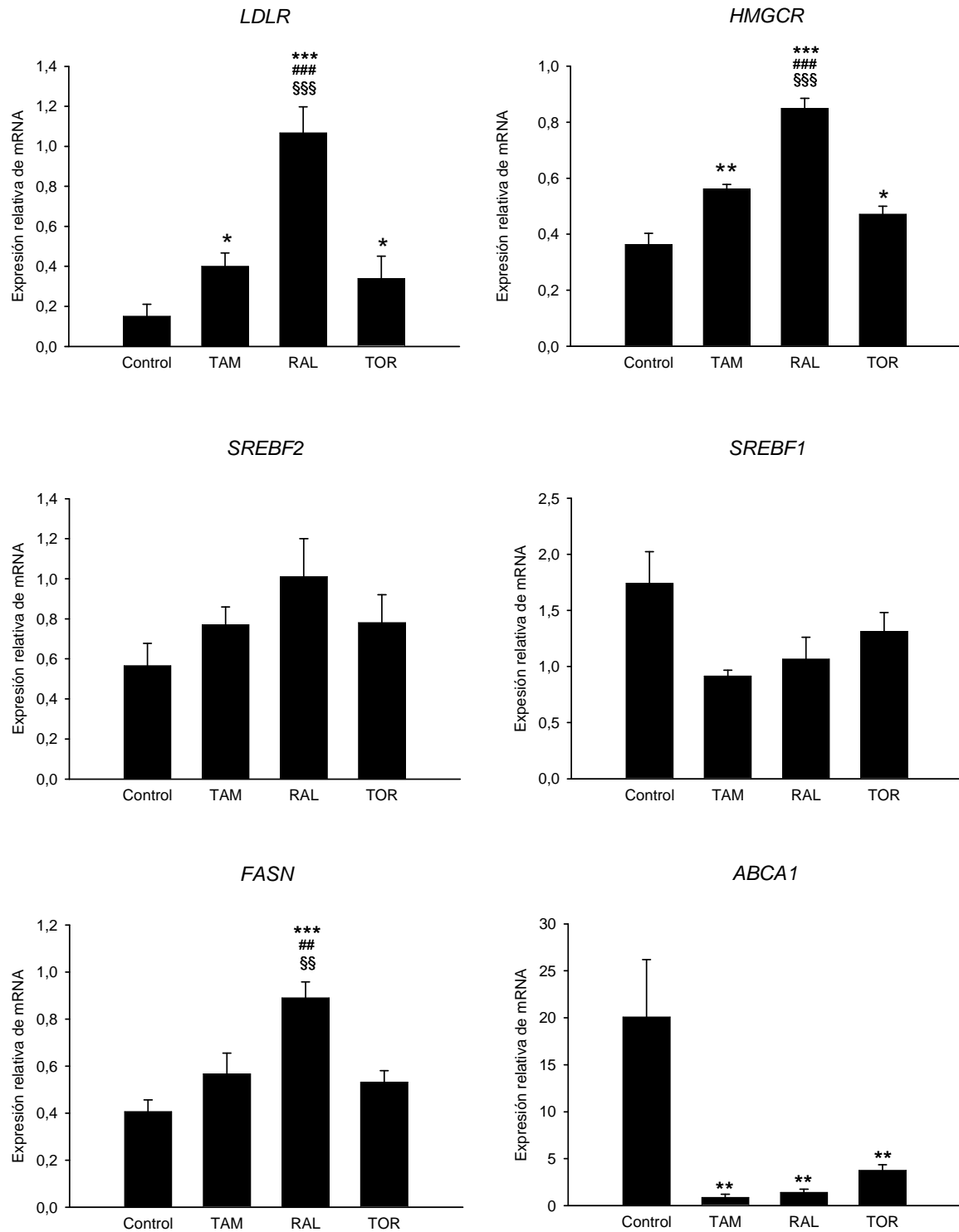


Figura 14. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la expresión génica en los linfocitos. Los linfocitos de 4 hombres se trataron con LPDS al 10 % solo o suplementado con 60 µg/ml LDL más vehículo (control) o una concentración 5 µM de TAM, RAL o TOR durante 8 h. Las cantidades de los mRNA de los genes estudiados están expresadas respecto a la condición con LPDS, a la que se asignó el valor 1. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía para medidas repetidas y posteriormente mediante el test de Student-Newman-Keuls. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs control; # $P < 0,01$, ## $P < 0,001$ vs RAL; \$\$ $P < 0,01$, \$\$\$ $P < 0,001$ vs TOR.

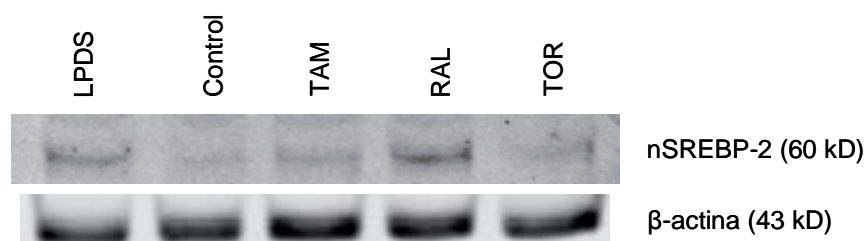


Figura 15. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre el contenido nuclear de SREBP-2 en los linfocitos. *Western blot* representativo de los linfocitos de 2 hombres. Los linfocitos se trataron con LPDS solo o suplementado con LDL más vehículo (control) o una concentración 5 μ M de TAM, RAL o TOR durante 8 h. Se obtuvo el extracto nuclear y 40 μ g de proteína se sometieron a SDS/PAGE para la inmunodetección de la forma nuclear de SREBP-2 (nSREBP-2) o β -actina como control de carga.

	Sujeto 1	Sujeto 2	Sujeto 3	<i>P</i> vs control
Control	100.0	100.0	100.0	-
TAM	32,3	48,8	60,8	0,001
RAL	42,0	70,1	61,7	0,002
TOR	52,1	70,1	80,8	0,003

Tabla 2. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la incorporación de [3 H]oleato a los ésteres de colesterol en los linfocitos. Los linfocitos de 3 hombres se trataron con 60 μ g/ml LDL más vehículo (control) o una concentración 5 μ M de TAM, RAL o TOR durante 24 h. A las 2 h de haber añadido el tratamiento se añadió el [3 H]oleato. Se determinó [3 H]dpm/mg de proteína celular y el resultado se expresó en porcentaje respecto al control de cada preparación de linfocitos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía para medidas repetidas y posteriormente mediante el test de Student-Newman-Keuls.

4.1.6. Análisis del efecto de la combinación de los SERM con la lovastatina sobre la actividad del receptor de LDL. Comparación con las células MOLT-4 y HepG2

Previamente, nuestro grupo ha descrito que el TAM ejerce un efecto sinérgico con la LOV sobre la estimulación de la actividad del rLDL en las células MOLT-4 [43], pero se desconoce si dicha propiedad es compartida con otros SERM. Para analizar esta posibilidad, las células MOLT-4 se trataron o no con los SERM 5 μ M, LOV 1 μ M o la combinación de ambos tipos de fármaco durante 24 h, al término de las cuales se analizó la captación de DiI-LDL. Como se muestra en la **figura 16A**, cada SERM incrementó significativamente la captación de DiI-LDL, siendo TAM y TOR similares en eficacia y sobrepasando esta a la del RAL. La adición de la LOV resultó en un efecto diferencial en función de la presencia o ausencia de SERM, tal y como indica la

interacción estadísticamente significativa ($P < 0,001$) entre ambos tipos de fármaco (SERM x LOV). La LOV sola no tuvo efecto alguno sobre la captación de DiI-LDL respecto a la condición sin fármacos, lo cual es atribuible al efecto represor que ejercen las LDL (**figura 16A**). Sin embargo, al combinarla con cada uno de los SERM la LOV incrementó dicha captación respecto a la obtenida con el SERM correspondiente (**figura 16A**). Estos resultados demuestran que no solo el TAM sino también el RAL y el TOR poseen un efecto sinérgico con la LOV sobre la actividad del rLDL en las células MOLT-4.

Dado que el hígado es crucial para el control de la concentración plasmática de colesterol y que la homeostasis del colesterol no es idéntica en el hepatocito y en otras células, estudiamos la respuesta a los SERM y la LOV en una línea de hepatocitos humanos, la línea HepG2. En estas células los tres SERM fueron igualmente efectivos entre sí estimulando la captación de DiI-LDL (**figura 16B**). Nuevamente, la LOV sola fue inefectiva, pero potenció el efecto de cada uno de los SERM (P para la interacción = 0,007) en grado algo mayor que en las células MOLT-4 (**figura 16B**).

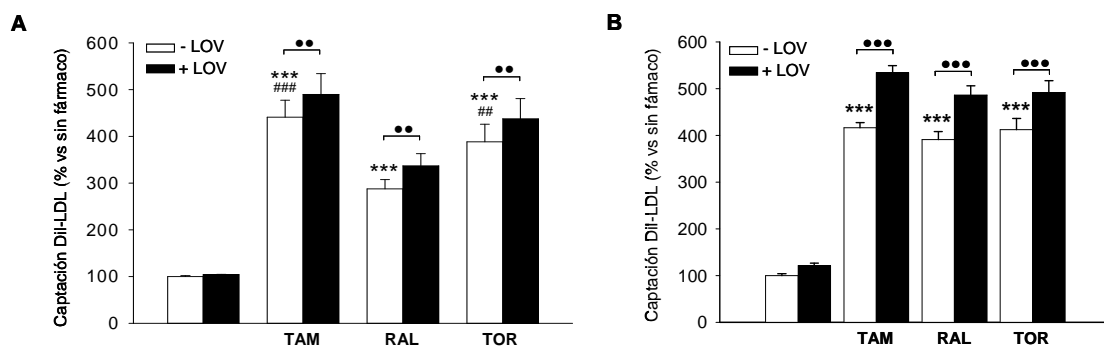


Figura 16. Efecto de la combinación de los SERM con lovastatina sobre la captación de DiI-LDL por las células MOLT-4 y HepG2. Las células MOLT-4 (A) y HepG2 (B) se trataron con 60 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL suplementadas con vehículo (control), con cada uno de los tres SERM 5 μM , con LOV 1 μM o las combinaciones de estos fármacos, según se indica, durante 24 h. Los resultados (media \pm error estándar) corresponden a 5 experimentos independientes en cada caso y están expresados en porcentaje respecto a la condición en ausencia de cualquier fármaco de cada experimento. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías para medidas repetidas y, después, mediante el método de Student-Newman-Keuls. ●● $P < 0,01$, ●●● $P < 0,001$ vs sin LOV; *** $P < 0,001$ vs control; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs RAL. Para simplificar, se han omitido las diferencias estadísticas entre las condiciones que llevan LOV.

Quisimos averiguar si el efecto sinérgico observado en las células MOLT-4 y HepG2 se reproducía en linfocitos primarios tratados en las mismas condiciones. En estas células, los SERM y la LOV también mostraron una interacción significativa ($P = 0,029$). Nuevamente, la LOV sola no alteró la captación de DiI-LDL **figura 17**. No obstante, el efecto sinérgico fue más leve en estas células que en las células MOLT-4 y HepG2, y solo la combinación de TAM y LOV produjo un incremento significativo de la captación de DiI-LDL respecto a la captación producida por el SERM solo (**figura 17**), (barras correspondientes a la dosis 5 μM de SERM).

Al comparar el efecto de cada uno de los SERM 5 μM entre las células MOLT-4 (**figura 16A**), HepG2 (**figura 16B**) y los linfocitos primarios (**figura 17**), (barras correspondientes a la dosis 5 μM de SERM), puede observarse que el grado de estimulación de la captación de DiI-LDL fue proporcionalmente mayor en las líneas celulares que en los linfocitos. Nos preguntamos si este hecho favorecía la respuesta sinérgica al tratamiento con SERM y LOV en las primeras respecto a los segundos. Por ello, y con el fin de potenciar el efecto de los SERM sobre los linfocitos primarios, decidimos incrementar la concentración de dichos fármacos a 10 μM y analizar el efecto de sus combinaciones con LOV como anteriormente. En estas condiciones, aumentó la significación estadística de la interacción entre SERM y LOV ($P = 0,006$) en relación a la obtenida al utilizar SERM 5 μM , observándose ahora un incremento significativo en la captación de DiI-LDL para la combinación de cada uno de los SERM con LOV respecto al correspondiente SERM solo (**figura 17**), (barras correspondientes a la dosis 10 μM de SERM). Por lo tanto, los tres SERM pueden tener un efecto sinérgico con la LOV sobre la actividad del rLDL de los linfocitos primarios, el cual está modulado por la concentración de aquellos fármacos.

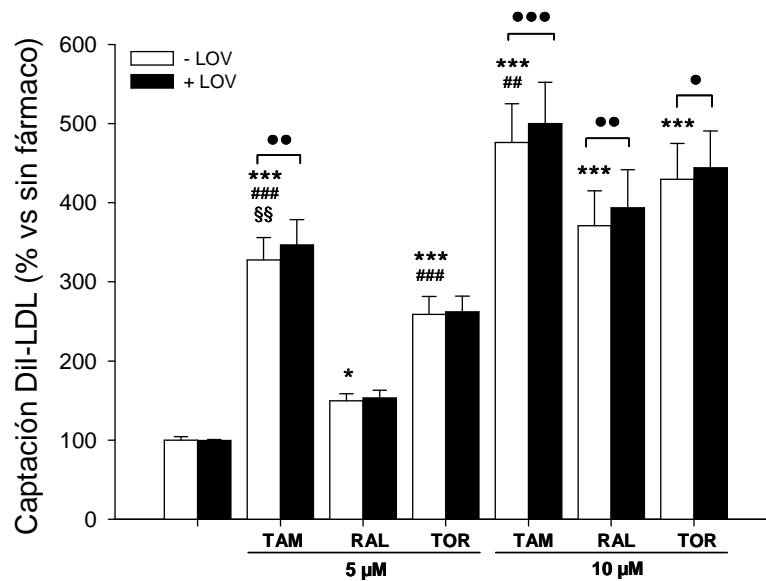


Figura 17. Efecto de la combinación de los SERM con lovastatina sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos. Los linfocitos de 10 hombres se incubaron con 60 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL suplementadas con vehículo (control) o TAM, RAL o TOR a concentraciones 5 μM o 10 μM , con LOV 1 μM o las combinaciones de estos fármacos, según se indica, durante 24 h. Los resultados (media \pm error estándar) están expresados como porcentaje de la condición en ausencia de cualquier fármaco de la misma preparación de linfocitos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías para medidas repetidas y, después, mediante el método de Student-Newman-Keuls. ● $P < 0,05$, ●● $P < 0,01$, ●●● $P < 0,001$ vs sin LOV; * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs control; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs RAL; §§ $P < 0,01$ vs TOR. Para mayor simplicidad, se han omitido las diferencias estadísticas entre las condiciones que llevan LOV.

4.1.7. Efectos de ICI 182,780 y 17 β -estradiol sobre la actividad del receptor de LDL

Para discriminar la implicación de los receptores de estrógenos (ER) en los efectos de los SERM, los linfocitos se trataron con los diferentes SERM o con 17 β -estradiol (E2) en ausencia o presencia de ICI 182,780, inhibidor de los ER [193]. Es conocido que el ICI 182,780 reduce la cantidad de ER α [194], tal y como nosotros observamos en los linfocitos con cada uno de los diferentes tratamientos, aunque en presencia de E2 el efecto fue escaso (**figura 18**). La presencia de ICI 182,780 en el medio no alteró el efecto estimulador de ninguno de los SERM sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos (**figura 18**). Por su parte, el tratamiento con un amplio rango de concentraciones de E2 no produjo efecto alguno sobre la captación de DiI-LDL, como tampoco lo produjo la combinación de esta hormona con ICI 182,780 (**figura 19**). Además, cuando se combinaron los SERM con E2 0,025 μM , no se alteró el efecto de ninguno de aquellos fármacos (**figura 19**). En su conjunto, estos resultados sugieren que los ER no están implicados en el efecto de los SERM sobre la actividad del rLDL en los linfocitos primarios.

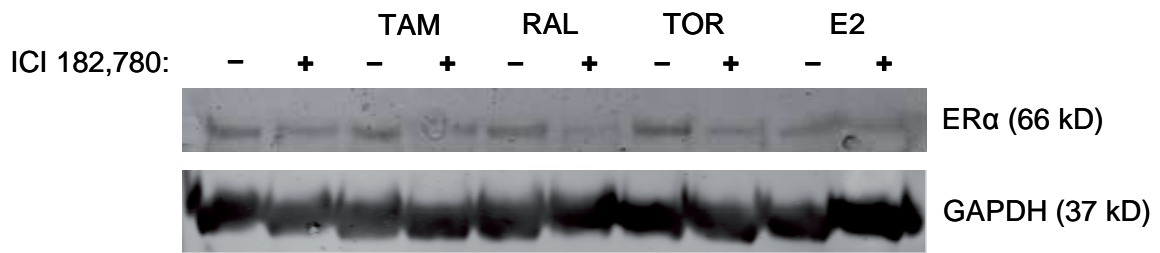


Figura 18. Efecto del ICI 182,780 sobre la expresión de proteína de ERα en presencia o ausencia de los SERM o E2 en los linfocitos. *Western blot* representativo de los linfocitos de dos hombres. Los linfocitos se trataron con 60 µg/ml DiI-LDL más vehículo o una concentración 5 µM de TAM, RAL o TOR, o E2 0,025 µM y en ausencia o presencia de ICI 182,780 1µM durante 24 h. Las células se lisaron y 100 µg de proteína se sometieron a SDS/PAGE para la inmunodetección de ERα o GAPDH como control de carga.

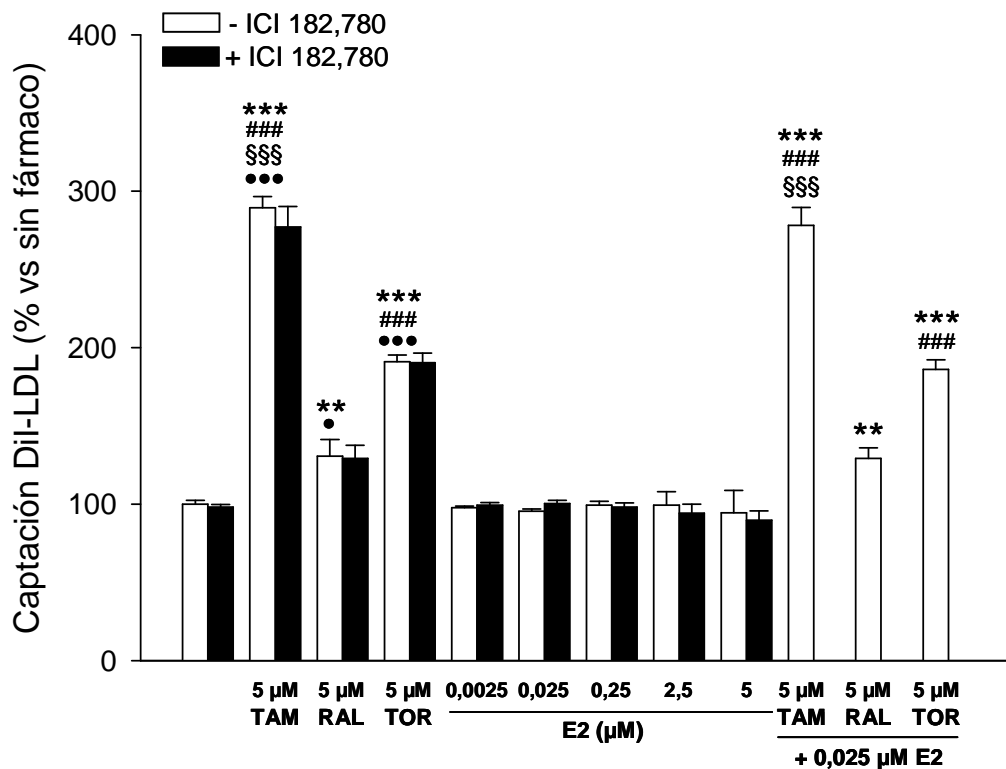


Figura 19. Efecto de E2 e ICI 182,780 sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos. Los linfocitos procedentes de 4 hombres se incubaron con 60 µg/ml DiI-LDL suplementadas con vehículo (control), una concentración 5 µM de TAM, RAL o TOR, E2 a concentraciones crecientes, ICI 182,780 1 µM o las combinaciones de estos compuestos, según se indica, durante 24 h. Los resultados (media ± error estándar) están expresados en porcentaje respecto a la condición en ausencia de cualquier fármaco de la misma preparación de linfocitos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías para medidas repetidas y, después, mediante el método de Student-Newman-Keuls. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs control; ### $P < 0,001$ vs RAL; §§§ $P < 0,001$ vs TOR; ● $P < 0,05$, ●●● $P < 0,001$ vs E2 5 µM. Para mayor simplicidad, no se muestran las diferencias entre las condiciones en presencia de ICI 182,780.

4.1.8. Efecto del endoxifeno sobre la actividad del receptor de LDL

Como se ha comentado en la Introducción (apartado 1.6.2.3.), la eficacia antitumoral del TAM radica en la biotransformación en sus metabolitos primarios 4-OH-TAM y 4-OH-N-desmetil-TAM, o endoxifeno (END). Ambos metabolitos poseen similar afinidad por los ER que el E2 y mucho más alta que el TAM [158]. Quisimos averiguar si el END, considerado el metabolito más importante del TAM [158], estimula, como el TAM, o no, como el E2, la actividad del rLDL en linfocitos. Para ello, tratamos los linfocitos con concentraciones crecientes de END, TAM 5 μM o E2 0,1 μM , todos ellos combinados o no con ICI 182,780. El END incrementó la captación de DiI-LDL de manera dependiente de la dosis, de tal forma que a la concentración de 5 μM igualó la magnitud del efecto del TAM a esa misma dosis (**figura 20**). Por su parte, el ICI 182,780 tampoco inhibió el efecto del END (**figura 20**). Por tanto, el END indujo la misma respuesta en la actividad del rLDL de los linfocitos que la producida por su precursor el TAM.

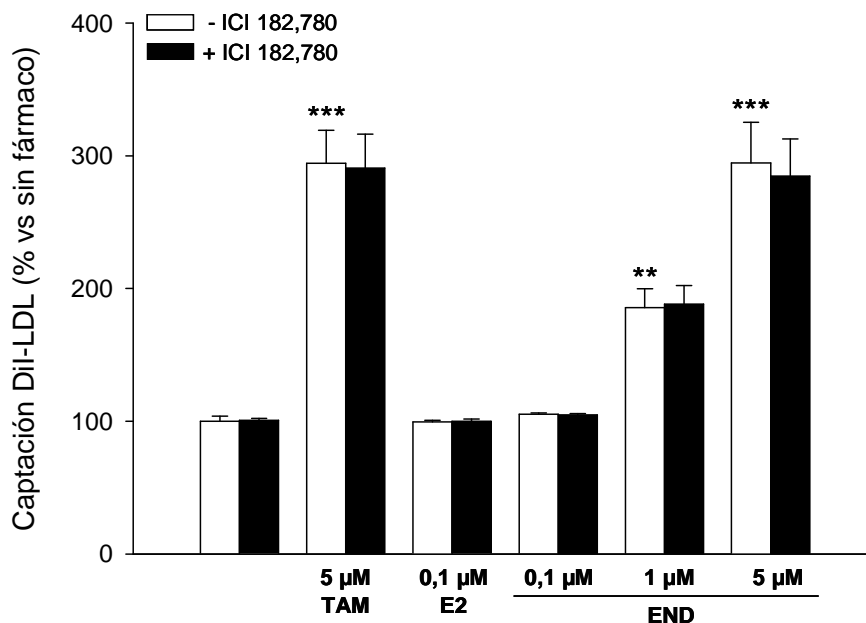


Figura 20. Efecto del END sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos. Los linfocitos procedentes de 4 hombres se trataron con 60 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL más vehículo (control), TAM 5 μM , E2 0,1 μM , o END a concentraciones crecientes y en combinación o no con ICI 182,780 1 μM , durante 24 h. Los resultados (media \pm error estándar) se expresaron en porcentaje respecto a la condición en ausencia de cualquier fármaco (control) de la misma preparación de linfocitos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías para medidas repetidas y, después, mediante el método de Student-Newman-Keuls. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs control. Para mayor simplicidad, no se muestran las diferencias estadísticas entre las condiciones en presencia de ICI 182,780.

4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS SERM SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE LDL EN LINFOCITOS DE PACIENTES CON HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Quisimos determinar el efecto de estos fármacos sobre la actividad del rLDL en linfocitos de pacientes con hipercolesterolemia familiar (FH), pacientes que se caracterizan por presentar una deficiencia de rLDL funcional. Estos linfocitos se analizaron simultáneamente y se compararon con los linfocitos de un grupo de sujetos normolipémicos (NL) distintos a los previamente estudiados para la caracterización del efecto de los SERM. En este estudio se incluyeron tanto hombres como mujeres (ver más abajo). A los pacientes incluidos en el grupo FH se les había diagnosticado dicha patología clínicamente. Pudimos corroborar que 17 de estos individuos eran portadores heterocigotos (HeFH) de una mutación en el rLDL (**tabla 3**), mientras que los 11 restantes del grupo FH no pudieron ser analizados genéticamente. Aparte de los pacientes diagnosticados clínicamente, estudiamos tres pacientes que conocíamos eran portadores homocigotos (HoFH) de mutaciones en el rLDL (**tabla 3**).

Sexo	Localización	Nucleótido	Efecto previsto	Estado	B _{max} unión (%)	B _{max} captación (%)
M	Ex 3, Int 3	c.274C>G, c.313+1G>C	p.Gln92Glu, aberrante splicing	heterocigoto, doble mutante	87.3	78.8
H	Ex 4, Ex 11	c.451_453delGCC, c.1618G>A	p.Ala151del, p.Ala540Thr	heterocigoto, doble mutante	48.9	44.3
H	Ex 4	c.676T>C	p.Ser226Pro	heterocigoto	29.5	23.8
H	Ex 4	c.676T>C	p.Ser226Pro	heterocigoto	52.6	56.7
M	Ex 7	c.1048C>T	p.Arg350X	heterocigoto	39.9	47.8
M	Ex 8	c.1136G>A	p.Cys379Tyr	heterocigoto	66.1	75.7
M	Ex 8	c.1136G>A	p.Cys379Tyr	heterocigoto	34.8	26.3
M	Ex 9	c.1285G>A	p.Val429Met	heterocigoto	49.5	65.8
H	Ex 9	c.1285G>A	p.Val429Met	heterocigoto	45.1	54.3
H	Ex 9	c.1285G>A	p.Val429Met	heterocigoto	52.6	59.8
M	Ex 11	c.1618G>A	p.Ala540Thr	heterocigoto	45.4	48.1
M	Ex 11	c.1618G>A	p.Ala540Thr	heterocigoto	55.7	53.2
M	Ex 11	c.1646G>A	p.Gly549Asp	heterocigoto	63.2	73.6
H	Ex 16-18	c.2312-?_2583+?del	p.Ala771_Ala860del	heterocigoto	32.1	52.3
H	Ex 16-18	c.2312-?_2583+?del	p.Ala771_Ala860del	heterocigoto	38.0	56.3
H	Ex 17	c.2475C>A	p.Asn825Lys	heterocigoto	115.4	82.5
M	Ex 17	c.2475C>A	p.Asn825Lys	heterocigoto	122.5	91.4
M	Ex 6, Ex 11	c.902A>G, c.1646G>T	p.Asp301Gly, p.Gly549Val	heterocigoto compuesto	19.5	21.1
M	Ex 11	c.1646G>A	p.Gly549Asp	homocigoto	9.7	9.7
H	Ex 17	c.2475C>A	p.Asn825Lys	homocigoto	72.6	16.9

Tabla 3. Mutaciones en el gen del rLDL y valores de la B_{max} de unión y captación de DiI-LDL de sujetos FH heterocigotos y homocigotos.

4.2.1. Determinación de las B_{max} de unión y captación del receptor de LDL

En primer lugar, determinamos la funcionalidad del rLDL en los linfocitos procedentes de los distintos individuos mediante el ensayo de la unión (a 4 °C) y la captación (a 37 °C) de concentraciones crecientes de DiI-LDL para determinar los valores de las respectivas B_{max} , tal y como se ha descrito en Material y Métodos (apartado 3.2.5). En cada serie de ensayos se aislaron y analizaron simultáneamente los linfocitos de un mismo donante NL (control interensayo), cuyos valores se utilizaron para normalizar los resultados.

Los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con lo esperado, puesto que los valores de B_{max} de unión y de captación en los linfocitos del grupo FH, así como en los de su subgrupo HeFH, fueron, en promedio, significativamente inferiores a los encontrados en el grupo NL (**figura 21**). Como puede apreciarse en la **figura 21**, dos de los pacientes HeFH presentaron valores de unión al rLDL por encima del valor del control interensayo (100 %). Estos pacientes eran portadores de la mutación Asn825Lys (**tabla 3**), la cual confiere un fenotipo de clase 4, caracterizado por una unión normal y una captación deficiente [195]. En cuanto al grupo HoFH, dos de los pacientes, uno de ellos heterocigoto compuesto (**tabla 3**), mostraron unión y captación residuales, mientras que el tercero mostró una captación residual y una unión del 73 % respecto al control (**figura 21**), lo que se corresponde con la presencia de la mutación Asn825Lys en homocigosidad (**tabla 3**) y, por tanto, un fenotipo de clase 4.

4.2.2. Efecto de los SERM sobre la actividad del receptor de LDL

Una vez constatada la deficiencia, en mayor o menor grado, de la actividad del rLDL en los sujetos hipercolesterolémicos, quisimos averiguar el efecto de los SERM sobre dicha actividad, para lo cual tratamos los linfocitos durante 24 h con los distintos SERM 5 μ M y medimos la captación de DiI-LDL. Nuevamente, utilizamos como control interensayo los linfocitos de un mismo donante NL para normalizar todos los resultados de captación. Dado que, como se ha dicho más arriba, en este estudio incluimos hombres y mujeres, evaluamos primero si el sexo influía en la captación de DiI-LDL por los linfocitos así como en el efecto de los SERM sobre la misma. Como se muestra en la **figura 22**, la captación de DiI-LDL por los linfocitos no tratados con SERM no fue significativamente diferente ($P = 0,345$) entre hombres ($110,0 \pm 5,8$, $n = 7$) y mujeres ($99,1 \pm 7,9$, $n = 12$) NL, ni tampoco hubo diferencias entre sexos en el efecto de los SERM (P para la interacción = $0,899$), lo cual confirma lo observado

anteriormente (figura 4). Así pues, decidimos analizar conjuntamente los resultados obtenidos con los linfocitos de hombres y mujeres.

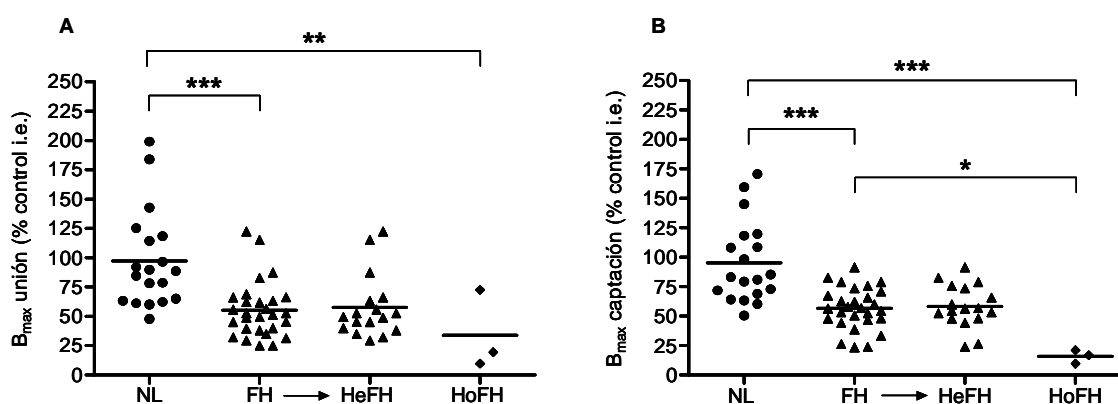


Figura 21. B_{max} de unión y captación en los linfocitos de sujetos normolipémicos y FH. Los linfocitos se incubaron con concentraciones crecientes de DiI-LDL durante 2 h a 4 °C y a 37 °C para determinar los valores de B_{max} de unión (A) y captación (B), respectivamente. Los resultados están expresados en porcentaje respecto al control interensayo (i.e.). Las líneas horizontales representan la media de cada grupo. NL, normolipémicos (n = 19); FH, pacientes con hipercolesterolemia familiar (n = 28); HeFH, FH heterocigotos (n = 17), subgrupo del grupo FH; HoFH, FH homocigotos (n = 3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y, después, mediante el método Student-Newman-Keuls. * $P < 0,1$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

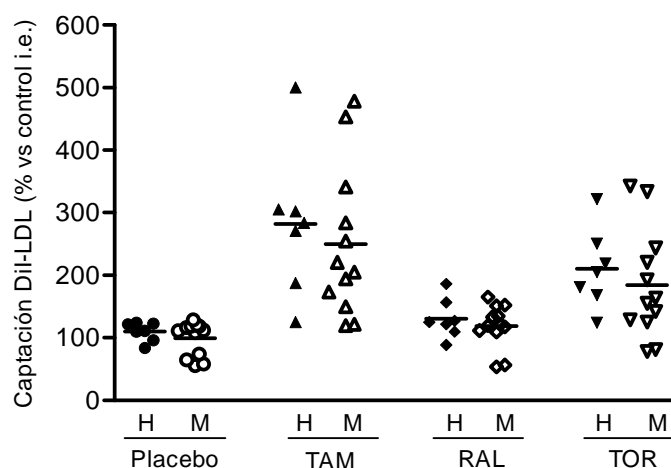


Figura 22. Influencia del sexo sobre el efecto del TAM, RAL y TOR en la captación de DiI-LDL por los linfocitos de sujetos normolipémicos. Los linfocitos de hombres (H) y mujeres (M) NL se trataron con DiI-LDL más vehículo (placebo) o una concentración 5 μ M de TAM, RAL o TOR durante 24 h. Los resultados (media \pm error estándar) se expresan como porcentaje del control (placebo) de la misma preparación de linfocitos. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías para medidas repetidas.

En cuanto al efecto de los SERM, los resultados en el grupo NL mostraron un incremento de la captación de DiI-LDL por efecto del TAM y TOR, siendo el primero más potente, mientras que el RAL no tuvo un efecto significativo (**figura 23A**), efectos que son coherentes con los hallados previamente. En los linfocitos del grupo FH, TAM y TOR también aumentaron la captación de DiI-LDL, pero con similar potencia (**figura 23B**). El RAL produjo un ligero aumento, pero en este caso alcanzando significación estadística (**figura 23B**). Cuando se analizaron únicamente los resultados del subgrupo HeFH (**figura 23C**), se observaron los mismos efectos que en el grupo FH. Por otro lado, nos preguntamos si el grado de estimulación producido por cada SERM es o no igual en los linfocitos del grupo NL que en los del grupo HeFH. Para compararlos, calculamos, en porcentaje, el efecto de cada SERM relativo a la captación por las correspondientes células no tratadas. Los resultados mostraron que el grado de estimulación de la captación de DiI-LDL por el TAM fue similar en los grupos NL y HeFH ($250,7 \pm 18,4$ % vs $250,4 \pm 19,2$ %, respectivamente; media \pm E.E.; $P = 0,988$), y lo mismo sucedió con el TOR ($189,1 \pm 14,3$ % vs $216,7 \pm 22,5$ %, respectivamente; $P = 0,285$) y el RAL ($122,3 \pm 7,4$ % vs $138,8 \pm 12,2$ %, respectivamente; $P = 0,246$). De hecho, no existió una interacción significativa entre los SERM y el grupo de sujetos estudiados ($P = 0,262$). Estos resultados sugieren que la deficiencia parcial de rLDL, como sucede en los pacientes HeFH, no influye en la efectividad de los SERM.

En lo que se refiere a los pacientes HoFH, ninguno de los tres SERM mostró un efecto apreciable sobre la captación de DiI-LDL por sus linfocitos (**figura 23D**), indicando que la presencia de rLDL funcional es necesaria para que el SERM sea efectivo.

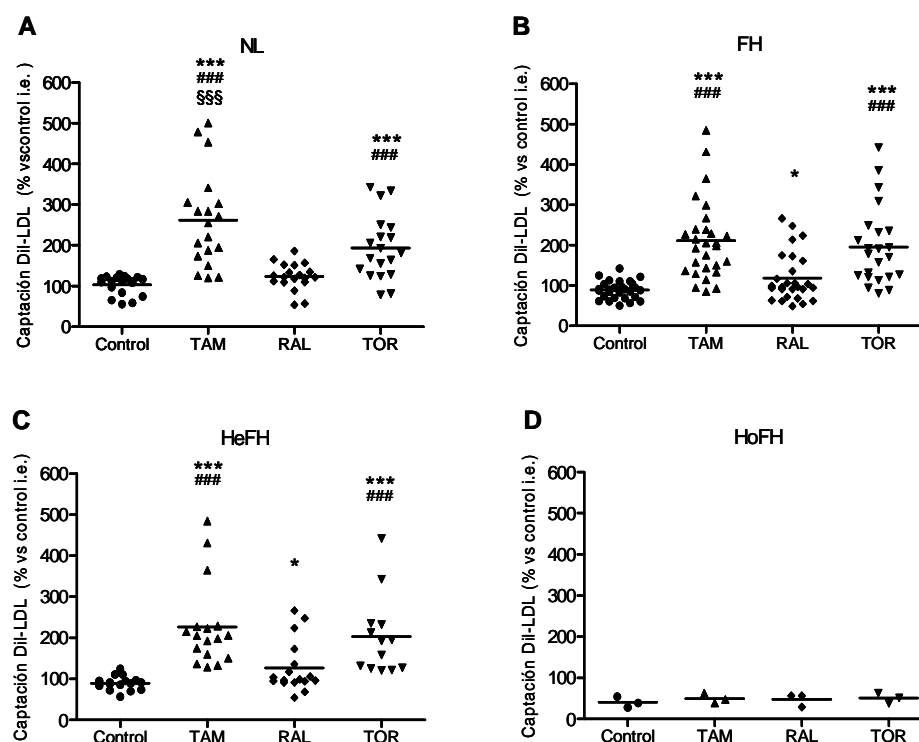


Figura 23. Efecto del TAM, RAL y TOR sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos de sujetos normolipémicos y FH. Los linfocitos se trataron con 60 $\mu\text{g/ml}$ DiI-LDL más vehículo (control) o una concentración 5 μM de TAM, RAL o TOR durante 24 h. A: Sujetos normolipémicos (NL, $n = 19$). B: Pacientes con hipercolesterolemia familiar (FH, $n = 28$). C: Pacientes FH heterocigotos (HeFH, $n = 17$, subgrupo del grupo FH). C: Pacientes FH homocigotos (HoFH, $n = 3$). Los resultados están expresados en porcentaje respecto al control interensayo (i.e.). Las líneas horizontales representan la media de cada tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía para medidas repetidas y, después, mediante el método Student-Newman-Keuls. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs control; ### $P < 0,001$ vs RAL; §§§ $P < 0,001$ vs TOR.

4.2.3. Análisis del efecto de la combinación de los SERM con la lovastatina sobre la actividad del receptor de LDL

A continuación, analizamos el efecto de la combinación de los distintos SERM con la LOV sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos de los sujetos NL y HeFH. Los resultados obtenidos en el grupo NL mostraron una interacción estadísticamente significativa ($P = 0,026$) entre los SERM y la LOV, lo cual confirma los hallazgos anteriores. Tampoco aquí tuvo efecto la adición de LOV sola, pero al combinarla con TAM y, en esta ocasión, RAL aumentó ligera, pero significativamente, la captación de DiI-LDL respecto a los correspondientes SERM solos (**figura 24**). En el grupo HeFH, en el cual solo pudimos realizar este análisis en 13 de los 17 sujetos, la LOV fue incapaz de aumentar la captación de las DiI-LDL; sin embargo, en las células de estos pacientes dicho fármaco no interactuó con los SERM ($P = 0,212$) (**figura 24**).

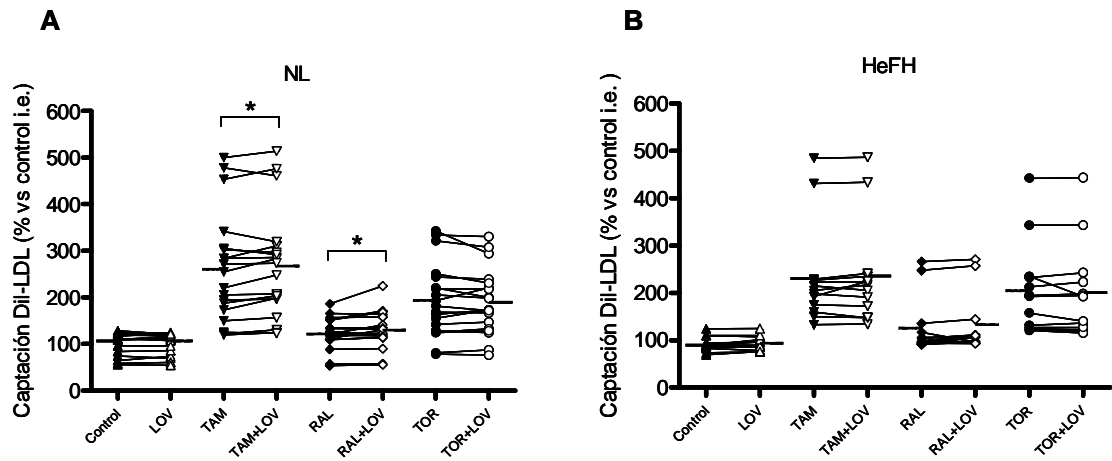


Figura 24. Efecto de los SERM en combinación con lovastatina sobre la captación de DiI-LDL por los linfocitos de sujetos normolipémicos y FH. Los linfocitos de los sujetos normolipémicos (NL) ($n = 19$) y FH heterocigotos (HeFH) ($n = 13$) se trataron con $60 \mu\text{g/ml}$ DiI-LDL más vehículo (control), una concentración $5 \mu\text{M}$ de TAM, RAL o TOR, LOV $1 \mu\text{M}$ o la combinación de estos fármacos, según se indica, durante 24 h. Los resultados están expresados en porcentaje respecto al control interensayo (i.e.). Las líneas horizontales representan la media de cada tratamiento. Los resultados en ausencia de LOV son los mismos que en la figura 16. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías para medidas repetidas y, después, mediante el método Student-Newman-Keuls. * $P < 0,05$. Para mayor simplicidad, se han omitido las diferencias estadísticas entre las condiciones que difieren en el SERM.

DISCUSIÓN

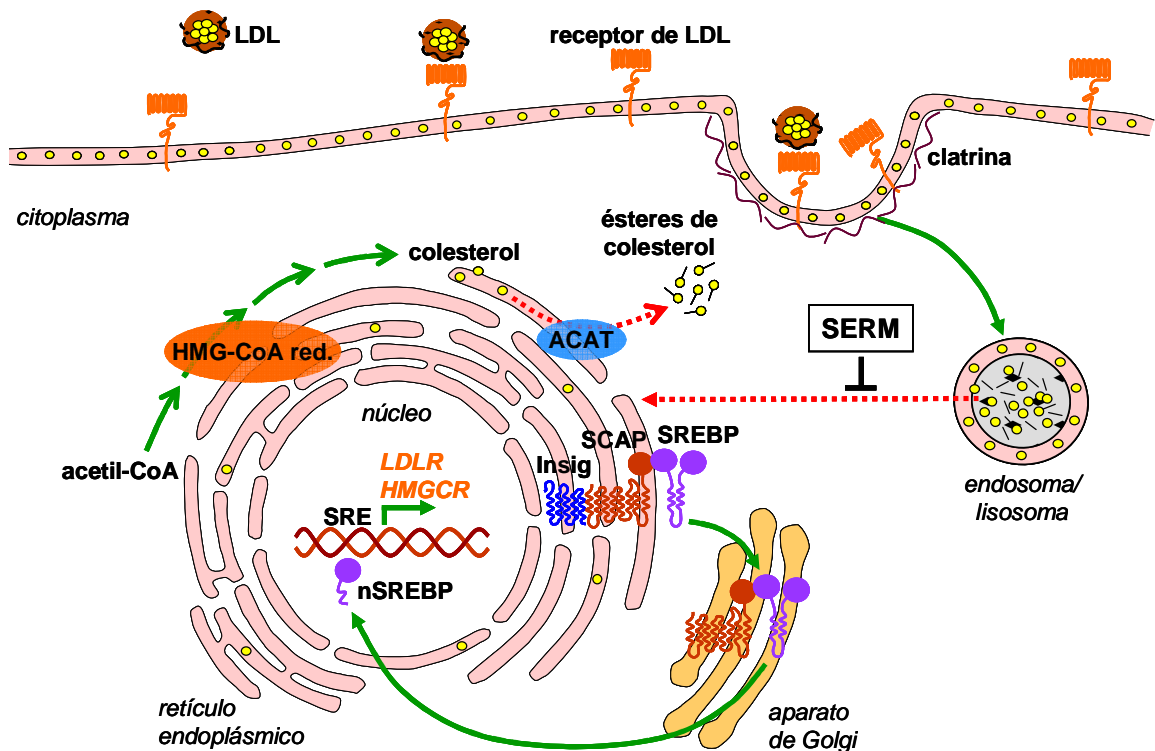
5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos estudiado los efectos del TAM, RAL y TOR, SERM ampliamente utilizados en la clínica, sobre la actividad del rLDL en linfocitos de sujetos NL y FH. Es bien conocido que el tratamiento con dichos fármacos causa la disminución de las concentraciones plasmáticas de cLDL como efecto secundario. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que dichos SERM estimulan la actividad del rLDL en los linfocitos humanos, efecto que radica en su oposición a la represión ejercida por las LDL sobre la expresión del rLDL. En general, el TAM es el más efectivo, mientras que el RAL es el SERM que presenta la menor potencia de los tres. El efecto estimulador de los SERM sobre la expresión y la actividad del rLDL está asociado a la acumulación del colesterol procedente de las LDL en el endosoma/lisosoma. Estos hallazgos confirman en linfocitos humanos primarios los obtenidos anteriormente en las células MOLT-4 tratadas con TAM [43] y, además, los amplían al TOR y RAL. Además, hemos demostrado que estos efectos se reproducen en la línea celular hepatocítica HepG2, en la cual el TAM también causa la acumulación vesicular del colesterol derivado de las LDL [43].

En este estudio hemos observado que los SERM también incrementan la actividad del rLDL en los linfocitos procedentes de sujetos FH, a excepción de los de pacientes HoFH, teniendo TAM y TOR mayor efecto que RAL. Aunque en aquellos linfocitos TAM y TOR muestran similar potencia entre ellos, la comparación directa de la magnitud de sus efectos entre los linfocitos de sujetos HeFH y NL indica que el grado de estimulación de la actividad del rLDL para cada uno de estos fármacos es similar en ambos grupos de sujetos. La ausencia de efecto de los SERM en las células de pacientes HoFH indica que la presencia de un rLDL funcional es necesaria para que el SERM sea efectivo, confirmando que estos fármacos estimulan la captación de las LDL mediante la vía del rLDL específicamente. Estos resultados demuestran, además, que el efecto de los SERM sobre la actividad del rLDL en los linfocitos con una deficiencia parcial de rLDL funcional, como ocurre en los sujetos HeFH, es similar que en los linfocitos de sujetos NL.

A pesar del incremento en la captación de LDL mediado por los SERM, la expresión y la actividad del rLDL permanece por encima de la condición control durante todo el periodo de tratamiento (**figuras 5 y 6**). Esto indica que los SERM

alteran la retroregulación del rLDL inducida por las LDL captadas. Una explicación plausible de este fenómeno implica a SREBP-2 (**esquema 9**). Así, debido al bloqueo de la salida del colesterol del endosoma/lisosoma derivado de las LDL, los SERM impiden la llegada del colesterol al retículo endoplásmico, donde residen los SREBP y, como indican nuestros resultados, ese colesterol es incapaz de inhibir el procesamiento de los SREBP y la expresión de los genes diana de SREBP-2, incluidos *LDLR* y *HMGCR*, y los genes diana de SREBP-1, incluido *FASN* [70,196]. Estos efectos son semejantes a los que ocurren en la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C (NPC) [197], causada por una deficiencia en las proteínas lisosomales NPC1 y NPC2, encargadas de la exportación del colesterol del lisosoma. Así pues, la inhibición del tráfico del colesterol exógeno puede explicar la estimulación de la actividad del rLDL por la falta de retroregulación por las LDL en las células tratadas con los SERM. Sin embargo, hay que destacar que, al igual que ocurre en las células no tratadas, la expresión del rLDL en los linfocitos tratados con los SERM va disminuyendo con el tiempo de exposición a las LDL (**figura 6**), lo cual sugiere que el bloqueo no es total y algo de colesterol sale del lisosoma y alcanza el compartimento regulador.



Esquema 9. Efecto de los SERM sobre la homeostasis celular del colesterol. Las flechas en verde indican activación y las flechas en línea roja discontinua indican inhibición.

La disminución de la esterificación del colesterol por efecto de los SERM también está de acuerdo con el bloqueo del transporte de colesterol al retículo endoplásmico, donde también se localiza ACAT (**esquema 9**). Sin embargo, no puede descartarse que la inhibición directa de esta enzima también contribuya a la disminución en las tasas de esterificación de colesterol, como se ha demostrado que ocurre en extractos microsomales de hígado de rata tratados con TAM, si bien el RAL muestra un efecto mucho más débil que el TAM en este sistema [181] y no se dispone de resultados anteriores para el TOR.

La oposición de los SERM a la estimulación de la expresión de *ABCA1* mediada por las LDL sugiere una alteración de la vía de LXR. LXR es un receptor nuclear activado por oxisteroles, productos de la oxidación del colesterol, el cual estimula la transcripción del gen *ABCA1*, que codifica una proteína (ABCA1) de la superficie celular que se encarga del transporte de colesterol hacia el exterior de la célula [192]. La disfunción observada en la vía de LXR de los linfocitos tratados con los SERM recapitula las deficiencias en la producción de dichos oxisteroles y en la consecuente activación del LXR encontradas en los fibroblastos NPC [198]. Sin embargo, no podemos descartar un papel para la vía de SREBP-2 en la disminución del contenido del mRNA de *ABCA1* causada por los SERM. Así, el aumento de la transcripción de *SREBF2*, la cual está regulada por SREBP-2, conllevaría el aumento de la expresión del microRNA-33a, codificado por el intrón 16 de dicho gen y que tiene como diana el mRNA de *ABCA1* [199,200].

En su conjunto, las alteraciones en las vías de SREBP y LXR inducidas por el tratamiento con los SERM resalta la importancia del tráfico intracelular del colesterol para la homeostasis del mismo, incluso en presencia de pequeños cambios en el contenido celular de colesterol. Debemos indicar aquí que la cantidad de gránulos de colesterol acumulados en el citoplasma de los linfocitos tratados con SERM dista considerablemente de las cantidades que se observan al tratar distintas líneas celulares [43,201]. Por otro lado, es preciso mencionar que en la represión de la expresión de *ABCA1* mediada por los SERM también puede estar implicado un mecanismo independiente del tráfico intracelular de colesterol. Se ha descrito que el TAM influye en dicha expresión a través del incremento de la concentración de 5,6-epoxicolesterol, un modulador de LXR cuyo efecto depende del contexto celular y génico [178,179].

Los presentes hallazgos también indican que los ER no están involucrados en la estimulación de la actividad del rLDL en linfocitos por los SERM, puesto que el antiestrógeno ICI 182,780 no inhibió el efecto de ninguno de ellos y, además, el E2 no tuvo efecto sobre dicha actividad. Estos resultados están de acuerdo con los previamente encontrados en las células MOLT-4 [43], las cuales se ha descrito que no expresan una cantidad significativa de ER [202]. Sin embargo, Brüning et al [94] mostraron que TAM y E2 son capaces de aumentar la transcripción del rLDL a través de la unión de un complejo ER α /Sp1 a un elemento Sp1 en cis presente en el promotor. Esto fue hallado mediante ensayos de gen reportero con el gen de la luciferasa en células HepG2 cotransfectadas con ER α , mientras que en células no cotransfectadas y en células cotransfectadas con ER β tanto TAM como E2 fueron incapaces de inducir la transcripción del gen reportero [94]. Esto sugiere que para observar un efecto mediado por los ER en la transcripción del rLDL se requiere una alta expresión de ER α . El hecho de que, como aquí se ha observado, los SERM sí incrementen la actividad del rLDL en las células HepG2 intactas reforzaría la idea de que estos fármacos son capaces de aumentar la expresión del rLDL por un mecanismo independiente de los ER. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que la estimulación de la actividad del rLDL de los linfocitos por los SERM es esencialmente independiente de los ER.

Como ya se conoce, los SERM, aunque con menor potencia que la LOV, son capaces de inhibir la biosíntesis de colesterol [43,155,173,174], lo que puede contribuir al incremento en la expresión del rLDL. Particularmente, Kedjouar et al [155], trabajando con células de cáncer de mama MCF-7, encontraron que el TAM y el RAL se unen e inhiben a AEBS, un complejo microsomal que contiene dos enzimas de la biosíntesis del colesterol, la 3 β -hidroxiestero- Δ^8 - Δ^7 -isomerasa (D8D7 o EBP) y la 3 β -hidroxiestero- Δ^7 -reductasa (DHCR7). Sin embargo, es improbable que este efecto tenga un papel significativo en los linfocitos primarios, pues estas células tienen una biosíntesis de colesterol muy poco activa y, en consonancia con ello, no hemos detectado precursores de colesterol con ninguno de los tratamientos. Esto está de acuerdo con las bajas tasas de biosíntesis de colesterol que tienen las células no proliferantes [203].

Es sabido que el TAM influye en la expresión de genes controlados por LXR mediante un mecanismo en el que está implicada la producción de ROS y la inhibición de la 5,6-epoxicolesterol hidrolasa [179], una actividad enzimática llevada a cabo por el

complejo AEBS [176]. Esto da lugar a la acumulación, entre otros epóxidos, de 5 α ,6 α -epoxicolesterol e, indirectamente, al incremento de la expresión del gen del rLDL en células de cáncer de mama [179]. Dado que la vitamina E suprime dichos efectos, estudiamos el efecto de la misma sobre el incremento de la actividad del rLDL mediado por los SERM en los linfocitos primarios. Nuestros resultados sugieren cierta implicación de ROS en el efecto de los SERM, especialmente del RAL, pero este no parece ser el mecanismo principal y común a los tres fármacos en los linfocitos primarios, distintamente a lo que ocurre en las células de cáncer de mama tratadas con TAM [179]. Probablemente, el efecto de los SERM en el tráfico intracelular del colesterol de los linfocitos y en la expresión del rLDL radica en las propiedades químicas que les otorga su estructura anfifílica, al igual que sucede con otros compuestos con similares características, como U18666A, AY-9944 [204] y fármacos antipsicóticos [40,205], que inducen la retención lisosomal del colesterol procedente de las LDL y la activación de los genes diana de SREBP. La retención del colesterol puede ser secundaria a la acumulación de dichos agentes en los lisosomas debido a un mecanismo de trampa de iones (ver más abajo), el cual ocurre cuando las aminas son protonadas en compartimentos con pH ácido como los lisosomas, donde quedan atrapadas por la imposibilidad de atravesar la membrana de los mismos [206]. El desigual efecto producido por TAM y TOR en relación a RAL sobre la actividad del rLDL en los linfocitos puede estar relacionado con su estructura química, pues TAM y TOR son derivados del trifeniletileno, diferenciándose entre ellos por la presencia de un átomo de Cl en la posición 4 del TOR, mientras que RAL es un derivado del benzotiofeno [163].

Cabe preguntarse por el mecanismo mediante el cual los SERM inducen la acumulación de colesterol en los endosomas/lisosomas. Una posibilidad es la interferencia en la función de la esfingomielinasa ácida, que cataliza la hidrólisis de la esfingomielina en el endosoma/lisosoma produciendo ceramida y fosforilcolina. Al pH ácido del endosoma/lisosoma, la esfingomielinasa está cargada positivamente, lo que le permite unirse a las vesículas intraliosomales, cuya superficie posee carga negativa gracias a la incorporación del fosfolípido aniónico bis-monoacilglicerofosfato (o ácido lisobisfosfatídico). En esta ubicación la esfingomielinasa actúa sobre su sustrato [207]. Se ha descrito que algunos fármacos anfifílicos catiónicos, como los antidepresivos imipramina y desipramina, desplazan a la esfingomielinasa de la superficie de dichas

vesículas, propiciando así la degradación de la enzima [208]. La consiguiente acumulación de esfingomielina en detrimento de ceramida inhibe la transferencia del colesterol por NPC2 y, por tanto, su exportación desde el lisosoma [209]. Ello se debe a que la esfingomielina tiene gran afinidad por el colesterol, reteniéndolo así en la vesícula, mientras que la ceramida tiene el efecto contrario. En consonancia con este modelo, la deficiencia de esfingomielinasa en la enfermedad de Niemann-Pick de los tipos A y B se asocia a la acumulación de colesterol en los endosomas/lisosomas [210]. Otro posible mecanismo para la acumulación de colesterol en estos orgánulos por efecto de los SERM es que estos se intercalen en la membrana de los endosomas/lisosomas de manera que distorsionen la función de NPC1, tal y como se ha sugerido para U18666A [211].

Al TAM se le considera un profármaco, ya que su actividad antitumoral se debe principalmente a su conversión en END y 4-OH-TAM, en la que es clave la acción de CYP2D6 [158,212]. Dichos metabolitos poseen mayor afinidad por los ER que el TAM y similar a la que tiene el E2 [213]. El END se considera el metabolito más importante, ya que en pacientes tratadas con TAM aquel presenta una mayor concentración circulante que el 4-OH-TAM [160,212]. Por su parte, los derivados hidroxilados del TOR se encuentran en mucha menor concentración in vivo que los del TAM, por lo que es previsible que no jueguen un papel tan importante en las acciones de aquel [171]. Los linfocitos no presentan actividad detectable de la enzima CYP2D6 [161], lo que indica que la conversión del TAM en sus metabolitos derivados no es necesaria para incrementar la actividad del rLDL. No obstante, nos preguntamos si el END es similar a su precursor o bien al E2 en sus efectos sobre la actividad del rLDL. Observamos que, al contrario que el E2, el END estimuló la actividad en la misma medida que el TAM y que el efecto tampoco fue inhibido por ICI 182,780. Esto sugiere que la transformación del TAM en sus derivados activos en aquellas células que poseen CYP2D6, como los hepatocitos, transformación que conlleva una hidroxilación y una desmetilación del N, preserva la capacidad del TAM para aumentar la actividad del rLDL por un mecanismo independiente de los ER. Probablemente, los dos intermediarios alternativos de esta biotransformación, 4-OH-TAM y N-desmetil-TAM [158] (**esquema 8**), también son capaces de aumentar la actividad del rLDL, pues estos compuestos comparten con el TAM y el END la característica de ser aminas anfifílicas catiónicas.

El aumento de la actividad del rLDL mediado por los SERM y el consiguiente aumento en la eliminación del cLDL podría contribuir al efecto hipolipemiante que estos fármacos muestran in vivo. En consonancia con esto, estudios realizados en ratas tratadas con el SERM acolbifeno han documentado un aumento de la expresión del rLDL hepático asociado a una disminución de la concentración plasmática de cLDL [214]. Como hemos comentado anteriormente, el presente estudio ha puesto de manifiesto que, de los tres SERM aquí evaluados, el RAL es el menos potente sobre la actividad del rLDL en linfocitos; no obstante, hay que destacar que este fármaco sí es efectivo reduciendo la concentración de cLDL in vivo [163]. Esto sugiere que el RAL podría ser más activo en otros tipos celulares, como, por ejemplo, los hepatocitos. Esta hipótesis está de acuerdo con la similar magnitud del efecto de los tres SERM en las células HepG2. Es pertinente indicar que las concentraciones de TAM empleadas en nuestro estudio se encuentran dentro del rango de las alcanzadas en los pacientes tratados con el mismo ($\sim 0,5 - 6 \mu\text{M}$) [215]. Además, el RAL, así como el TOR, es habitualmente administrado a dosis más elevadas que el TAM [216], lo cual podría compensar las diferencias entre las potencias de los tres fármacos observadas in vitro (**figura 2**).

Existen otros mecanismos que podrían contribuir al efecto hipolipemiante de los SERM, como la inhibición de la biosíntesis de colesterol, mencionada anteriormente [43,155,173,174]. Además, también podrían participar en dicho efecto la supresión de la esterificación del colesterol por la ACAT, como muestran nuestros resultados y otros previos [181], y la modulación de la expresión de los genes diana de LXR [178,179], como hemos observado en este trabajo para *ABCA1*.

Tal y como habíamos descrito anteriormente para el TAM [43], el RAL y el TOR son capaces de estimular la actividad del rLDL en las células MOLT-4 y, además, de ejercer un efecto sinérgico cuando se añaden en combinación con la LOV. En las células HepG2 hemos observado respuestas similares con todos los SERM. El efecto nulo que en ambos casos presentó la LOV cuando se añadió sola es atribuible al predominio del efecto represor que ejercen las LDL a esa concentración sobre el rLDL [43]. Sin embargo, en combinación con cada uno de los SERM la LOV es capaz de aumentar la captación de DiI-LDL por encima de la alcanzada con el correspondiente SERM solo. Esto es compatible con la idea de que el SERM, al limitar la disponibilidad del colesterol lipoproteico, activa la biosíntesis de colesterol (**esquema 9**), lo que

permite a la LOV ejercer su acción inhibitoria sobre esta ruta y, así, activar la expresión del rLDL. De este modo, los distintos mecanismos de acción de los SERM, por un lado, y de la LOV, por el otro, explicarían la sinergia sobre la actividad del rLDL cuando se combinan ambos tipos de fármacos.

En los linfocitos primarios, la LOV sola tampoco tuvo un efecto detectable sobre la actividad del rLDL. Cuando se combinó con los SERM se produjo una sinergia más débil que la observada en las células MOLT-4 y HepG2. Así, cuando los linfocitos se trataron en las mismas condiciones que las líneas celulares, utilizando una concentración de SERM igual a 5 μ M, solo se observó un efecto sinérgico con TAM y, menos regularmente, con RAL. En los linfocitos de los pacientes HeFH, no se produjo efecto sinérgico con ninguno de los SERM, como indica la falta de interacción entre estos y la LOV. Desconocemos si la falta de respuesta de estas células al tratamiento combinado guarda o no alguna relación con la deficiencia de rLDL que las mismas presentan. Por otro lado, nuestros resultados con los linfocitos de pacientes NL indican que el efecto sinérgico entre los SERM y la LOV depende, al menos en parte, de la magnitud del efecto de los primeros. Así, cuando incrementamos esta mediante el tratamiento de los linfocitos con una concentración de SERM 10 μ M, los tres SERM produjeron un efecto sinérgico con la estatina. Esto sugiere, en consonancia con la hipótesis planteada para las células MOLT-4 y HepG2, que la mayor restricción de la disponibilidad del colesterol lipoproteico causada por la mayor dosis de SERM aumenta la susceptibilidad de los linfocitos para responder a la LOV, lo que, previsiblemente, debe estar asociado a cierta activación de la biosíntesis de colesterol en respuesta a la mayor reducción de la llegada del colesterol lipoproteico al retículo endoplásmico por efecto de los SERM (**esquema 9**). Por ello, no podemos descartar que el tratamiento de los linfocitos de los pacientes HeFH con una mayor concentración de SERM en combinación con LOV permita observar un efecto sinérgico. La menor sensibilidad de los linfocitos primarios que las células MOLT-4 y HepG2 al efecto sinérgico puede ser consecuencia del menor requerimiento de colesterol en las primeras células, lo que mantiene la biosíntesis de este lípido muy poco activa.

A pesar del débil efecto sinérgico entre los SERM y la LOV sobre la actividad del rLDL en los linfocitos primarios, no podemos descartar la posibilidad de que, in vivo, dicho efecto tenga una mayor magnitud en células y tejidos con un activo metabolismo del colesterol, como en el hígado, el cual juega un papel crucial en la

homeostasis del colesterol en el organismo. Si bien las células HepG2 fueron las que respondieron más intensamente a los tratamientos combinados, la falta de un efecto significativo de la LOV sola no se corresponde con lo que se ha descrito que sucede en el hígado in vivo. Así, se ha documentado que la administración de estatinas a humanos inhibe la biosíntesis de colesterol [217] e incrementa la expresión del rLDL hepático [35]. Esto indica que la biosíntesis hepática de colesterol permanece activa en presencia de concentraciones fisiológicas de LDL, haciendo a esta vía sensible a la inhibición por las estatinas y a la consiguiente estimulación de la expresión del rLDL. En esta situación, la administración simultánea de un SERM pudiera ser capaz de incrementar aún más la expresión del rLDL. A favor de esta hipótesis, un estudio que evaluó la eficacia de la administración conjunta de RAL y dosis bajas de sinvastatina a mujeres posmenopáusicas encontró que dicho tratamiento era más eficaz reduciendo las concentraciones plasmáticas de colesterol y apo B que la administración de cualquiera de esos fármacos por separado [218]. Aunque son necesarios más estudios sobre la eficacia del tratamiento combinado y sus posibles efectos secundarios, la administración conjunta de una estatina y un agente que se oponga a la represión que ejercen las LDL, como una amina anfifílica catiónica, pudiera ser una alternativa para aquellos pacientes que no logran alcanzar una adecuada concentración de colesterol usando las terapias convencionales con estatinas [120]. Además, dicha estrategia pudiera evitar el uso de altas dosis de estatinas, reduciendo así el riesgo de padecer eventos adversos [219].

En resumen, en el presente estudio hemos demostrado que TAM, TOR y RAL, en este orden, estimulan la actividad y expresión del rLDL en linfocitos primarios humanos mediante la interferencia en los mecanismos homeostáticos del colesterol, siendo sus efectos similares en sujetos NL y HeFH. La combinación de esos SERM con LOV produce un aumento adicional moderado en la actividad del rLDL en los linfocitos primarios comparativamente con el producido en las células HepG2 y MOLT-4. La estimulación de la expresión del rLDL mediada por los SERM es independiente de los ER, pero el metabolito activo del TAM, el END, produce un aumento similar al producido por el TAM, lo cual apoya la hipótesis de que la estructura anfifílica catiónica de los SERM es crucial para dicho efecto. Sugerimos que este mecanismo contribuye a la disminución de las concentraciones de cLDL que causan los SERM.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno estimulan la expresión y actividad del receptor de LDL en linfocitos primarios humanos, siendo el tamoxifeno y el raloxifeno el más y el menos potente, respectivamente, en estos efectos.
2. El mecanismo implicado en el aumento de la expresión del receptor de LDL por los SERM es el bloqueo de la exportación del colesterol de las LDL desde los endosomas tardíos/lisosomas, previniendo así que este colesterol pueda llegar al retículo endoplásmico e impedir la activación de SREBP-2.
3. Los SERM, además de activar las vías de SREBP-2 y SREBP-1, inhiben la actividad de la ACAT y la expresión de la diana de LXR *ABCA1*, todo lo cual es compatible con la reducción de la disponibilidad celular de colesterol.
4. El efecto de los SERM sobre el receptor de LDL es independiente de los receptores de estrógenos.
5. El endoxifeno, metabolito activo del tamoxifeno, tiene el mismo efecto que este fármaco sobre la actividad del receptor de LDL y la acumulación de endosomas/lisosomas ricos en colesterol, hechos que, unidos a los efectos del raloxifeno y toremifeno, sugieren que las propiedades antifílicas de estos fármacos subyacen a la retención endosomal de dicho lípido.
6. Los SERM sensibilizan a las células frente a la acción de la lovastatina sobre la actividad del receptor de LDL, y la combinación de ambos fármacos produce un efecto sinérgico.
7. El efecto sinérgico sobre la actividad del receptor de LDL en los linfocitos primarios es más débil que en las líneas celulares HepG2 y MOLT-4, lo cual pudiera deberse a la escasa biosíntesis de colesterol en aquellas células.
8. El grado de estimulación de la actividad del receptor de LDL por los SERM en los linfocitos de pacientes FH con una deficiencia parcial de receptor es el mismo que en los linfocitos de sujetos normolipémicos.
9. En los linfocitos de pacientes FH portadores homocigotos de una mutación en el receptor de LDL, los SERM no producen ningún efecto sobre la actividad del receptor, lo cual indica que el incremento de la captación de LDL por estos fármacos se realiza específicamente a través del receptor de LDL funcional.

10. Proponemos que el aumento de la actividad del receptor de LDL por los SERM mediante la interferencia en el tráfico intracelular del colesterol está implicado en la disminución de la concentración de colesterol-LDL en pacientes tratados con tamoxifeno, raloxifeno o toremifeno.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. 2011.
2. Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2013;93:1317-1542.
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-241.
4. Ren G, Rudenko G, Ludtke SJ, Deisenhofer J, Chiu W, Pownall HJ. Model of human low-density lipoprotein and bound receptor based on cryoEM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;107:1059-1064.
5. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* 2005;438:612-621.
6. Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science.* 1996;274:255-259.
7. Nybakken K, Perrimon N. Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12:503-511.
8. Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science.* 2001;294:1354-1357.
9. Goritz C, Mauch DH, Pfrieder FW. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci.* 2005;29:190-201.
10. Martínez-Botas J, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *Faseb J.* 1999;13:1359-1370.
11. Fernández C, Lobo MdVT, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Exp Cell Res.* 2004;300:109-120.
12. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 2006;124:35-46.
13. Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol.* 2010;204:233-240.
14. Trzaskos J, Kawata S, Gaylor JL. Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. Purification of lanosterol 14 α -methyl demethylase cytochrome P-450 from hepatic microsomes. *J Biol Chem.* 1986;261:14651-14657.
15. Kawata S, Trzaskos JM, Gaylor JL. Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis from lanosterol. Purification and characterization of Δ^7 -sterol 5-desaturase of rat liver microsomes. *J Biol Chem.* 1985;260:6609-6617.
16. Kovacs WJ, Shackelford JE, Tape KN, Richards MJ, Faust PL, Fliesler SJ, Krisans SK. Disturbed cholesterol homeostasis in a peroxisome-deficient PEX2 knockout mouse model. *Mol Cell Biol.* 2004;24:1-13.
17. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343:425-430.

18. Rodwell VW, Nordstrom JL, Mitschelen JJ. Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv Lipid Res.* 1976;14:1-74.
19. Friesen JA, Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol.* 2004;5:248.
20. Huneus VQ, Wiley MH, Siperstein MD. Isopentenyladenine as a mediator of mevalonate-regulated DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:5842-5846.
21. Cuthbert JA, Lipsky PE. Regulation of proliferation and Ras localization in transformed cells by products of mevalonate metabolism. *Cancer Res.* 1997;57:3498-3505.
22. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:241-269.
23. Marin Bivens CL, Grondahl C, Murray A, Blume T, Su YQ, Eppig JJ. Meiosis-activating sterol promotes the metaphase I to metaphase II transition and preimplantation developmental competence of mouse oocytes maturing in vitro. *Biol Reprod.* 2004;70:1458-1464.
24. Rozman D, Seliskar M, Cotman M, Fink M. Pre-cholesterol precursors in gametogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;234:47-56.
25. Sharpe LJ, Brown AJ. Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR). *J Biol Chem.* 2013;288:18707-18715.
26. Houten SM, Wanders RJ, Waterham HR. Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529:19-32.
27. Horvat S, McWhir J, Rozman D. Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons for drug development and safer treatments. *Drug Metab Rev.* 2011;43:69-90.
28. Vitols S, Norgren S, Juliusson G, Tatidis L, Luthman H. Multilevel regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in normal and leukemic cells. *Blood.* 1994;84:2689-2698.
29. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997;89:331-340.
30. Radhakrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:6511-6518.
31. Choi JW, Peffley DM. 3'-untranslated sequences mediate post-transcriptional regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA by 25-hydroxycholesterol. *Biochem J.* 1995;307 (Pt 1):233-238.
32. Peffley DM, Gayen AK. Mevalonate regulates polysome distribution and blocks translation-dependent suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA: relationship to translational control. *Somat Cell Mol Genet.* 1995;21:189-204.

33. Canto C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:3407-3423.
34. Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA. Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem.* 2003;278:52479-52490.
35. Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:517-526.
36. Nave JF, d'Orchymont H, Ducep JB, Piriou F, Jung MJ. Mechanism of the inhibition of cholesterol biosynthesis by 6-fluoromevalonate. *Biochem J.* 1985;227:247-254.
37. Castillo M, Martínez-Cayuela M, Zafra MF, García-Peregrín E. Effect of phenylalanine derivatives on the main regulatory enzymes of hepatic cholesterologenesis. *Mol Cell Biochem.* 1991;105:21-25.
38. Reszka AA, Rodan GA. Mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Osteoporos Rep.* 2003;1:45-52.
39. Bergstrom JD, Kurtz MM, Rew DJ, Amend AM, Karkas JD, Bostedor RG, Bansal VS, Dufresne C, VanMiddlesworth FL, Hensens OD, et al. Zaragozic acids: a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:80-84.
40. Canfrán-Duque A, Casado ME, Pastor O, Sánchez-Wandelmer J, de la Pena G, Lerma M, Mariscal P, Bracher F, Lasunción MA, Busto R. Atypical antipsychotics alter cholesterol and fatty acid metabolism in vitro. *J Lipid Res.* 2013;54:310-324.
41. Dvornik D, Hill P. Effect of long-term administration of AY-9944, an inhibitor of 7-dehydrocholesterol Δ^7 -reductase, on serum and tissue lipids in the rat. *J Lipid Res.* 1968;9:587-595.
42. Boogaard A, Griffioen M, Cohen LH. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in human hepatoma cell line Hep G2. Effects of inhibitors of cholesterol synthesis on enzyme activity. *Biochem J.* 1987;241:345-351.
43. Suárez Y, Fernández C, Gómez-Coronado D, Ferruelo AJ, Dávalos A, Martínez-Botas J, Lasunción MA. Synergistic upregulation of low-density lipoprotein receptor activity by tamoxifen and lovastatin. *Cardiovasc Res.* 2004;64:346-355.
44. Fernández C, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Inhibition of cholesterol biosynthesis by Δ^{22} -unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol Δ^{24} -reductase in mammalian cells. *Biochem J.* 2002;366:109-119.
45. Lasunción MA, Gómez-Coronado D, Suárez Y. Lipoproteínas: características, clasificación y proteínas que intervienen en su metabolismo. In *Aterosclerosis.*, J. Millan, ed. (Barcelona, Masson). 2005.
46. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 2002;43:1363-1379.

47. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)*. 2002;80:753-769.
48. Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Matsuzawa Y. Molecular biology and pathophysiological aspects of plasma cholesteryl ester transfer protein. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1529:257-275.
49. Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2012;414:215-224.
50. Calvo D, Gómez-Coronado D, Suárez Y, Lasunción MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*. 1998;39:777-788.
51. van Berkel TJ, Out R, Hoekstra M, Kuiper J, Biessen E, van Eck M. Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*. 2005;16:525-535.
52. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1702-1711.
53. Vantourout P, Radojkovic C, Lichtenstein L, Pons V, Champagne E, Martinez LO. Ecto-F(1)-ATPase: a moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor. *World J Gastroenterol*. 2010;16:5925-5935.
54. Hafiane A, Genest J. HDL, Atherosclerosis, and Emerging Therapies. *Cholesterol*. 2013;2013:891403.
55. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986;232:34-47.
56. Tolleshaug H, Goldstein JL, Schneider WJ, Brown MS. Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell*. 1982;30:715-724.
57. Pearse BM. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73:1255-1259.
58. Marsh M, Bolzau E, Helenius A. Penetration of Semliki Forest virus from acidic prelysosomal vacuoles. *Cell*. 1983;32:931-940.
59. He G, Gupta S, Yi M, Michaely P, Hobbs HH, Cohen JC. ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J Biol Chem*. 2002;277:44044-44049.
60. Zhao Z, Pompey S, Dong H, Weng J, Garuti R, Michaely P. S-nitrosylation of ARH is required for LDL uptake by the LDL receptor. *J Lipid Res*. 2013;54:1550-1559.
61. Kang RS, Folsch H. ARH cooperates with AP-1B in the exocytosis of LDLR in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*. 2011;193:51-60.
62. Soutar AK. Unexpected roles for PCSK9 in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22:192-196.
63. Chang TY, Li BL, Chang CC, Urano Y. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E1-9.
64. Maxfield FR, van Meer G. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22:422-429.

65. Chang TY, Reid PC, Sugii S, Ohgami N, Cruz JC, Chang CC. Niemann-Pick type C disease and intracellular cholesterol trafficking. *J Biol Chem.* 2005;280:20917-20920.
66. Rudenko G, Henry L, Henderson K, Ichtchenko K, Brown MS, Goldstein JL, Deisenhofer J. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science.* 2002;298:2353-2358.
67. Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1990;265:3116-3123.
68. Go GW, Mani A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med.* 2012;85:19-28.
69. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet.* 1990;24:133-170.
70. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2002;67:491-498.
71. Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11603-11607.
72. Brown AJ, Sun L, Feramisco JD, Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell.* 2002;10:237-245.
73. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* 2002;110:489-500.
74. Gong Y, Lee JN, Lee PC, Goldstein JL, Brown MS, Ye J. Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab.* 2006;3:15-24.
75. Adams CM, Goldstein JL, Brown MS. Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10647-10652.
76. Espenshade PJ, Li WP, Yabe D. Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11694-11699.
77. Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J Biol Chem.* 2005;280:26483-26490.
78. Kong WJ, Liu J, Jiang JD. Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation. *J Mol Med (Berl).* 2006;84:29-36.
79. Janowski BA, Shan B, Russell DW. The hypocholesterolemic agent LY295427 reverses suppression of sterol regulatory element-binding protein processing mediated by oxysterols. *J Biol Chem.* 2001;276:45408-45416.

80. Wilson GM, Vasa MZ, Deeley RG. Stabilization and cytoskeletal-association of LDL receptor mRNA are mediated by distinct domains in its 3' untranslated region. *J Lipid Res.* 1998;39:1025-1032.
81. Singh AB, Kan CF, Shende V, Dong B, Liu J. A novel posttranscriptional mechanism for dietary cholesterol-mediated suppression of liver LDL receptor expression. *J Lipid Res.* 2014.
82. Wang Y, Huang Y, Hobbs HH, Cohen JC. Molecular characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-mediated degradation of the LDLR. *J Lipid Res.* 2012;53:1932-1943.
83. Jeong HJ, Lee HS, Kim KS, Kim YK, Yoon D, Park SW. Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res.* 2008;49:399-409.
84. Li J, Tumanut C, Gavigan JA, Huang WJ, Hampton EN, Tumanut R, Suen KF, Trauger JW, Spraggon G, Lesley SA, Liau G, Yowe D, Harris JL. Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J.* 2007;406:203-207.
85. Fisher TS, Lo Surdo P, Pandit S, Mattu M, Santoro JC, Wisniewski D, Cummings RT, Calzetta A, Cubbon RM, Fischer PA, Tarachandani A, De Francesco R, Wright SD, Sparrow CP, Carfi A, Sitlani A. Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J Biol Chem.* 2007;282:20502-20512.
86. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, Varghese AH, Ammirati MJ, Culp JS, Hoth LR, Mansour MN, McGrath KM, Seddon AP, Shenolikar S, Stutzman-Engwall KJ, Warren LC, Xia D, Qiu X. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:413-419.
87. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, Alborn WE, Konrad RJ, Cao G. Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;370:634-640.
88. McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 2007;282:20799-20803.
89. Fan D, Yancey PG, Qiu S, Ding L, Weeber EJ, Linton MF, Fazio S. Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry.* 2008;47:1631-1639.
90. Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science.* 2009;325:100-104.
91. Scotti E, Calamai M, Goulbourne CN, Zhang L, Hong C, Lin RR, Choi J, Pilch PF, Fong LG, Zou P, Ting AY, Pavone FS, Young SG, Tontonoz P. IDOL stimulates clathrin-independent endocytosis and multivesicular body-mediated lysosomal degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Mol Cell Biol.* 2013;33:1503-1514.

92. Sniderman AD, Qi Y, Ma CI, Wang RH, Naples M, Baker C, Zhang J, Adeli K, Kiss RS. Hepatic cholesterol homeostasis: is the low-density lipoprotein pathway a regulatory or a shunt pathway? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:2481-2490.
93. Li C, Briggs MR, Ahlborn TE, Kraemer FB, Liu J. Requirement of Sp1 and estrogen receptor α interaction in 17 β -estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology.* 2001;142:1546-1553.
94. Bruning JC, Lingohr P, Gillette J, Hanstein B, Avci H, Krone W, Muller-Wieland D, Kotzka J. Estrogen receptor- α and Sp1 interact in the induction of the low density lipoprotein-receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;86:113-121.
95. Ness GC. Thyroid hormone. Basis for its hypocholesterolemic effect. *J Fla Med Assoc.* 1991;78:383-385.
96. Streicher R, Kotzka J, Muller-Wieland D, Siemeister G, Munck M, Avci H, Krone W. SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem.* 1996;271:7128-7133.
97. Bakker O, Hudig F, Meijssen S, Wiersinga WM. Effects of triiodothyronine and amiodarone on the promoter of the human LDL receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249:517-521.
98. Kotzka J, Lehr S, Roth G, Avci H, Knebel B, Muller-Wieland D. Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J Biol Chem.* 2004;279:22404-22411.
99. Stopeck AT, Nicholson AC, Mancini FP, Hajjar DP. Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1993;268:17489-17494.
100. Gierens H, Nauck M, Roth M, Schinker R, Schurmann C, Scharnagl H, Neuhaus G, Wieland H, Marz W. Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1777-1783.
101. Liu J, Streiff R, Zhang YL, Vestal RE, Spence MJ, Briggs MR. Novel mechanism of transcriptional activation of hepatic LDL receptor by oncostatin M. *J Lipid Res.* 1997;38:2035-2048.
102. Hsu HY, Nicholson AC, Hajjar DP. Basic fibroblast growth factor-induced low density lipoprotein receptor transcription and surface expression. Signal transduction pathways mediated by the bFGF receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1994;269:9213-9220.
103. Huang W, Mishra V, Batra S, Dillon I, Mehta KD. Phorbol ester promotes histone H3-Ser10 phosphorylation at the LDL receptor promoter in a protein kinase C-dependent manner. *J Lipid Res.* 2004;45:1519-1527.
104. Kumar A, Middleton A, Chambers TC, Mehta KD. Differential roles of extracellular signal-regulated kinase-1/2 and p38(MAPK) in interleukin-1 β - and

- tumor necrosis factor- α -induced low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1998;273:15742-15748.
105. Wilson GM, Roberts EA, Deeley RG. Modulation of LDL receptor mRNA stability by phorbol esters in human liver cell culture models. *J Lipid Res.* 1997;38:437-446.
 106. Kong W, Wei J, Abidi P, Lin M, Inaba S, Li C, Wang Y, Wang Z, Si S, Pan H, Wang S, Wu J, Li Z, Liu J, Jiang JD. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med.* 2004;10:1344-1351.
 107. Durrington P. Hyperlipidemia, diagnosis and management 3^a edition. Ed. *Hodder Arnold.* 2007.
 108. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown AJ. Familial hypercholesterolemia. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 2001:2863-2913.
 109. De Castro-Oros I, Pocoví M, Civeira F. The genetic basis of familial hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutations. *Appl Clin Genet.* 2010;3:53-64.
 110. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:587-591.
 111. Choong ML, Koay ES, Khoo KL, Khaw MC, Sethi SK. Denaturing gradient-gel electrophoresis screening of familial defective apolipoprotein B-100 in a mixed Asian cohort: two cases of arginine3500-->tryptophan mutation associated with a unique haplotype. *Clin Chem.* 1997;43:916-923.
 112. Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP. Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest.* 1995;95:1225-1234.
 113. Fouchier SW, Defesche JC, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Familial defective apolipoprotein B versus familial hypercholesterolemia: an assessment of risk. *Semin Vasc Med.* 2004;4:259-264.
 114. Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest.* 2003;111:1795-1803.
 115. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villeger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154-156.
 116. García CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, Calandra S, Bertolini S, Cossu F, Grishin N, Barnes R, Cohen JC, Hobbs HH. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science.* 2001;292:1394-1398.
 117. Wilund KR, Yi M, Campagna F, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Ho YK, Garcia JV, Hobbs HH, Cohen JC. Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet.* 2002;11:3019-3030.

118. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. 2000;290:1771-1775.
119. Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ, Kane JP. Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest*. 2002;110:109-117.
120. Thompson GR, O'Neill F, Seed M. Why some patients respond poorly to statins and how this might be remedied. *Eur Heart J*. 2002;23:200-206.
121. Davidson MH, Donovan JM, Misir S, Jones MR. A 50-week extension study on the safety and efficacy of colesvelam in adults with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2010;10:305-314.
122. García-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR, Jr., Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, Macintyre DE, Ogawa A, O'Neill K A, Iyer SP, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT, Thornberry NA. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:8132-8137.
123. Bambauer R, Bambauer C, Lehmann B, Latza R, Schiel R. LDL-apheresis: technical and clinical aspects. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:314283.
124. Wierzbicki AS, Hardman T, Prince WT. Future challenges for microsomal transport protein inhibitors. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009;7:277-286.
125. Toth PP. Emerging LDL therapies: Mipomersen-antisense oligonucleotide therapy in the management of hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2013;7:S6-10.
126. Farnier M. PCSK9 inhibitors. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24:251-258.
127. Graham MJ, Lemonidis KM, Whipple CP, Subramaniam A, Monia BP, Crooke ST, Crooke RM. Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J Lipid Res*. 2007;48:763-767.
128. Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, Racie TS, Bramlage B, Akinc A, Butler D, Charisse K, Dorkin R, Fan Y, Gamba-Vitalo C, Hadwiger P, Jayaraman M, John M, Jayaprakash KN, Maier M, Nechev L, Rajeev KG, Read T, Rohl I, Soutschek J, Tan P, Wong J, Wang G, Zimmermann T, de Fougères A, Vornlocher HP, Langer R, Anderson DG, Manoharan M, Kotliansky V, Horton JD, Fitzgerald K. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:11915-11920.
129. Shan L, Pang L, Zhang R, Murgolo NJ, Lan H, Hedrick JA. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;375:69-73.
130. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, Davignon J, Seidah NG, Bernier L, Prat A. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase

- neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1454-1459.
131. Mbikay M, Sirois F, Mayne J, Wang GS, Chen A, Dewpura T, Prat A, Seidah NG, Chretien M, Scott FW. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. *FEBS Lett.* 2010;584:701-706.
132. Sharotri V, Collier DM, Olson DR, Zhou R, Snyder PM. Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *J Biol Chem.* 2012;287:19266-19274.
133. Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;89:44-55.
134. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247:75-78.
135. Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. Estrogen receptor β acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene.* 2000;19:4970-4978.
136. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : impact on human health. *Mol Aspects Med.* 2006;27:299-402.
137. Auricchio F, Migliaccio A, Di Domenico M, Nola E. Oestradiol stimulates tyrosine phosphorylation and hormone binding activity of its own receptor in a cell-free system. *Embo J.* 1987;6:2923-2929.
138. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999;20:321-344.
139. Kalaitzidis D, Gilmore TD. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16:46-52.
140. Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Nardulli AM. Fos and Jun inhibit estrogen-induced transcription of the human progesterone receptor gene through an activator protein-1 site. *Mol Endocrinol.* 2004;18:521-532.
141. Lee YR, Park J, Yu HN, Kim JS, Youn HJ, Jung SH. Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17 β -estradiol through activation of estrogen receptor- α , but not estrogen receptor- β , and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336:1221-1226.
142. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7:715-726.
143. Malyala A, Kelly MJ, Ronnekleiv OK. Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids.* 2005;70:397-406.
144. Pickar JH, MacNeil T, Ohleth K. SERMs: progress and future perspectives. *Maturitas.* 2010;67:129-138.
145. Teran Davila J, Teppa Garran AD. [Selective estrogen receptors modulators (SERMs): biochemistry, pharmacology, and clinical use in gynecology]. *Ginecol Obstet Mex.* 2005;73:424-435.

146. Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;85:47-51.
147. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature.* 1996;383:728-731.
148. Umetani M, Domoto H, Gormley AK, Yuhanna IS, Cummins CL, Javitt NB, Korach KS, Shaul PW, Mangelsdorf DJ. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat Med.* 2007;13:1185-1192.
149. DuSell CD, Umetani M, Shaul PW, Mangelsdorf DJ, McDonnell DP. 27-hydroxycholesterol is an endogenous selective estrogen receptor modulator. *Mol Endocrinol.* 2008;22:65-77.
150. Ciruelos E, Pascual T, Arroyo Vozmediano ML, Blanco M, Manso L, Parrilla L, Muñoz C, Vega E, Calderón MJ, Sancho B, Cortés-Funes H. The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Breast.* 2014.
151. Gutman M, Couillard S, Labrie F, Candas B, Labrie C. Effects of the antiestrogen EM-800 (SCH 57050) and cyclophosphamide alone and in combination on growth of human ZR-75-1 breast cancer xenografts in nude mice. *Cancer Res.* 1999;59:5176-5180.
152. Dutertre M, Smith CL. Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295:431-437.
153. Gundimeda U, Chen ZH, Gopalakrishna R. Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J Biol Chem.* 1996;271:13504-13514.
154. de Medina P, Favre G, Poirot M. Multiple targeting by the antitumor drug tamoxifen: a structure-activity study. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2004;4:491-508.
155. Kedjouar B, de Medina P, Oulad-Abdelghani M, Payre B, Silvente-Poirot S, Favre G, Faye JC, Poirot M. Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J Biol Chem.* 2004;279:34048-34061.
156. Silvente-Poirot S, Poirot M. Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12:696-703.
157. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Biomedicine. Defining the "S" in SERMs. *Science.* 2002;295:2380-2381.
158. Stearns V, Rae JM. Pharmacogenetics and breast cancer endocrine therapy: CYP2D6 as a predictive factor for tamoxifen metabolism and drug response? *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e34.
159. Wegman P, Elingarami S, Carstensen J, Stal O, Nordenskjold B, Wingren S. Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2007;9:R7.
160. Lim YC, Li L, Desta Z, Zhao Q, Rae JM, Flockhart DA, Skaar TC. Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes

- in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318:503-512.
161. McConnachie LA, Phillips B, Bajpai M, Shen DD, Ho RJ. Only truncated, not complete cytochrome p450 2D6 RNA transcript and no detectable enzyme activity are expressed in human lymphocytes. *Drug Metab Dispos.* 2003;31:1103-1107.
162. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005;5:6-13.
163. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med.* 2003;348:618-629.
164. Liu CL, Yang TL. Sequential changes in serum triglyceride levels during adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients and the effect of dose reduction. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;79:11-16.
165. Grainger DJ, Schofield PM. Tamoxifen for the prevention of myocardial infarction in humans: preclinical and early clinical evidence. *Circulation.* 2005;112:3018-3024.
166. Grainger DJ, Witchell CM, Metcalfe JC. Tamoxifen elevates transforming growth factor- β and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med.* 1995;1:1067-1073.
167. Butta A, MacLennan K, Flanders KC, Sacks NP, Smith I, McKinna A, Dowsett M, Wakefield LM, Sporn MB, Baum M, et al. Induction of transforming growth factor β 1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer Res.* 1992;52:4261-4264.
168. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A, Jordan VC. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama.* 1999;281:2189-2197.
169. Hochner-Celnikier D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;85:23-29.
170. Dodge JA, Lugar CW, Cho S, Short LL, Sato M, Yang NN, Spangle LA, Martin MJ, Phillips DL, Glasebrook AL, Osborne JJ, Frolik CA, Bryant HU. Evaluation of the major metabolites of raloxifene as modulators of tissue selectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997;61:97-106.
171. Kim J, Coss CC, Barrett CM, Mohler ML, Bohl CE, Li CM, He Y, Veverka KA, Dalton JT. Role and pharmacologic significance of cytochrome P-450 2D6 in oxidative metabolism of toremifene and tamoxifen. *Int J Cancer.* 2013;132:1475-1485.
172. Kusama M, Miyauchi K, Aoyama H, Sano M, Kimura M, Mitsuyama S, Komaki K, Doihara H. Effects of toremifene (TOR) and tamoxifen (TAM) on serum lipids in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;88:1-8.
173. Gylling H, Pyrhonen S, Mantyla E, Maenpaa H, Kangas L, Miettinen TA. Tamoxifen and toremifene lower serum cholesterol by inhibition of $\Delta 8$ -

- cholesterol conversion to lathosterol in women with breast cancer. *J Clin Oncol*. 1995;13:2900-2905.
174. Holleran AL, Lindenthal B, Aldaghtas TA, Kelleher JK. Effect of tamoxifen on cholesterol synthesis in HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Metabolism*. 1998;47:1504-1513.
175. Newman JW, Morisseau C, Hammock BD. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res*. 2005;44:1-51.
176. de Medina P, Paillasse MR, Segala G, Poirot M, Silvente-Poirot S. Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13520-13525.
177. Shah VP, Chegini HA, Vishneski SR, Weatherman RV, Blackmore PF, Dobrydneva Y. Tamoxifen promotes superoxide production in platelets by activation of PI3-kinase and NADPH oxidase pathways. *Thromb Res*. 2012;129:36-42.
178. Berrodin TJ, Shen Q, Quinet EM, Yudt MR, Freedman LP, Nagpal S. Identification of 5 α ,6 α -epoxycholesterol as a novel modulator of liver X receptor activity. *Mol Pharmacol*. 2010;78:1046-1058.
179. Segala G, de Medina P, Iuliano L, Zerbinati C, Paillasse MR, Noguier E, Dalenc F, Payre B, Jordan VC, Record M, Silvente-Poirot S, Poirot M. 5,6-Epoxycholesterols contribute to the anticancer pharmacology of tamoxifen in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2013;86:175-189.
180. Nishino M, Hayakawa K, Nakamura Y, Morimoto T, Mukaihara S. Effects of tamoxifen on hepatic fat content and the development of hepatic steatosis in patients with breast cancer: high frequency of involvement and rapid reversal after completion of tamoxifen therapy. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;180:129-134.
181. de Medina P, Payre BL, Bernad J, Bossier I, Pipy B, Silvente-Poirot S, Favre G, Faye JC, Poirot M. Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308:1165-1173.
182. Mata P, Alonso R, Castillo S, Pocoví M. MEDPED and the Spanish Familial Hypercholesterolemia Foundation. *Atheroscler Suppl*. 2002;2:9-11.
183. Alonso R, Mata N, Castillo S, Fuentes F, Sáenz P, Muñiz O, Galiana J, Figueras R, Díaz JL, Gómez-Enterría P, Mauri M, Piedecausa M, Irigoyen L, Aguado R, Mata P. Cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis*. 2008;200:315-321.
184. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
185. Gutiérrez C, Bernabé RR, Vega J, Kreisler M. Purification of human T and B cells by a discontinuous density gradient of percoll. *J Immunol Methods*. 1979;29:57-63.

186. Suárez Y, Martínez-Botas J, Ortega H, Ferruuelo AJ, Gómez-Coronado D, Teruel JL, Lasunción MA. Determinación de la actividad del receptor de LDL en linfocitos mediante citometría de flujo para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar. *Clin. Invest. Arterioscl.* 1997;9(2):47-54.
187. Lasunción MA, Teruel JL, Álvarez JJ, Carrero P, Ortuño J, Gómez-Coronado D. Changes in lipoprotein(a), LDL-cholesterol and apolipoprotein B in homozygous familial hypercholesterolaemic patients treated with dextran sulfate LDL-apheresis. *Eur J Clin Invest.* 1993;23:819-826.
188. Pitas RE, Innerarity TL, Weinstein JN, Mahley RW. Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy. *Arteriosclerosis.* 1981;1:177-185.
189. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497-509.
190. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
191. Morello KC, Wurz GT, DeGregorio MW. Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42:361-372.
192. Kalaany NY, Mangelsdorf DJ. LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:159-191.
193. Robertson JF. ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data. *Br J Cancer.* 2001;85 Suppl 2:11-14.
194. Pink JJ, Jordan VC. Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1996;56:2321-2330.
195. Martínez-Botas J, Suárez Y, Reshef A, Carrero P, Ortega H, Gómez-Coronado D, Teruel JL, Leitersdorf E, Lasunción MA. Impact of different low-density lipoprotein (LDL) receptor mutations on the ability of LDL to support lymphocyte proliferation. *Metabolism.* 1999;48:834-839.
196. Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S15-27.
197. Liscum L, Faust JR. Low density lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J Biol Chem.* 1987;262:17002-17008.
198. Frolov A, Zielinski SE, Crowley JR, Dudley-Rucker N, Schaffer JE, Ory DS. NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. *J Biol Chem.* 2003;278:25517-25525.
199. Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernandez-Hernando C. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science.* 2010;328:1570-1573.
200. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Naar AM. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science.* 2010;328:1566-1569.
201. de Medina P, Payre B, Boubekour N, Bertrand-Michel J, Terce F, Silvente-Poirot S, Poirot M. Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell

- death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism. *Cell Death Differ.* 2009;16:1372-1384.
202. Danel L, Menouni M, Cohen JH, Magaud JP, Lenoir G, Revillard JP, Saez S. Distribution of androgen and estrogen receptors among lymphoid and haemopoietic cell lines. *Leuk Res.* 1985;9:1373-1378.
203. Lasunción MA, Martín-Sánchez C, Canfrán-Duque A, Busto R. Post-lanosterol biosynthesis of cholesterol and cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12:717-723.
204. Issandou M, Guillard R, Boullay AB, Linhart V, Lopez-Perez E. Up-regulation of low-density lipoprotein receptor in human hepatocytes is induced by sequestration of free cholesterol in the endosomal/lysosomal compartment. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:2281-2289.
205. Kristiana I, Sharpe LJ, Catts VS, Lutze-Mann LH, Brown AJ. Antipsychotic drugs upregulate lipogenic gene expression by disrupting intracellular trafficking of lipoprotein-derived cholesterol. *Pharmacogenomics J.* 2010;10:396-407.
206. Goldman SD, Funk RS, Rajewski RA, Krise JP. Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes. *Bioanalysis.* 2009;1:1445-1459.
207. Kolter T, Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett.* 2010;584:1700-1712.
208. Arenz C. Small molecule inhibitors of acid sphingomyelinase. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26:1-8.
209. Abdul-Hammed M, Breiden B, Adebayo MA, Babalola JO, Schwarzmann G, Sandhoff K. Role of endosomal membrane lipids and NPC2 in cholesterol transfer and membrane fusion. *J Lipid Res.* 2010;51:1747-1760.
210. Schulze H, Sandhoff K. Lysosomal lipid storage diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3.
211. Cenedella RJ. Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids.* 2009;44:477-487.
212. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310:1062-1075.
213. Goetz MP, Kamal A, Ames MM. Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:160-166.
214. Lemieux C, Gelinat Y, Lalonde J, Labrie F, Cianflone K, Deshaies Y. Hypolipidemic action of the SERM acolbifene is associated with decreased liver MTP and increased SR-BI and LDL receptors. *J Lipid Res.* 2005;46:1285-1294.
215. Etienne MC, Milano G, Fischel JL, Frenay M, Francois E, Formento JL, Giovanni J, Namer M. Tamoxifen metabolism: pharmacokinetic and in vitro study. *Br J Cancer.* 1989;60:30-35.
216. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER, Jr., Wade JL, 3rd, Robidoux A,

- Margolese RG, James J, Lippman SM, Runowicz CD, Ganz PA, Reis SE, McCaskill-Stevens W, Ford LG, Jordan VC, Wolmark N. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama*. 2006;295:2727-2741.
217. Naoumova RP, Marais AD, Mountney J, Firth JC, Rendell NB, Taylor GW, Thompson GR. Plasma mevalonic acid, an index of cholesterol synthesis in vivo, and responsiveness to HMG-CoA reductase inhibitors in familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 1996;119:203-213.
218. Insull W, Jr., Davidson MH, Kulkarni PM, Siddhanti S, Ciaccia AV, Keech CA. Effects of raloxifene and low-dose simvastatin coadministration on plasma lipids in postmenopausal women with primary hypercholesterolemia. *Metabolism*. 2005;54:939-946.
219. Maggo SD, Kennedy MA, Clark DW. Clinical implications of pharmacogenetic variation on the effects of statins. *Drug Saf*. 2011;34:1-19.

PUBLICACIONES

RESEARCH PAPER

Clinically used selective oestrogen receptor modulators increase LDL receptor activity in primary human lymphocytes

F Cerrato¹, M E Fernández-Suárez^{1,2}, R Alonso³, M Alonso⁴,
C Vázquez^{2,5*}, O Pastor⁶, P Mata^{3†}, M A Lasunción^{1,2} and
D Gómez-Coronado^{1,2}

¹Servicio de Bioquímica-Investigación, ⁶Servicio de Bioquímica Clínica, ⁴Servicio de Pediatría, ⁵Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS), Madrid, Spain, ³Lipid Clinic, Internal Medicine Department, Instituto de Investigación Sanitaria, Fundación Jiménez Díaz-IDC, Madrid, Spain, and ²CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Correspondence

Diego Gómez-Coronado, Servicio de Bioquímica-Investigación, Planta-1D, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS), Ctra. de Colmenar, km 9, E-28034 Madrid, Spain. E-mail: diego.gomez@hrc.es

Present addresses: *Departamento de Endocrinología y Nutrición, Fundación Jiménez Díaz – IDC, Madrid, Spain.

†Fundación Hipercolesterolemia Familiar, Madrid, Spain.

Received

2 April 2014

Revised

28 October 2014

Accepted

6 November 2014

BACKGROUND AND PURPOSE

Treatment with selective oestrogen receptor modulators (SERMs) reduces low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels. We assessed the effect of tamoxifen, raloxifene and toremifene and their combinations with lovastatin on LDL receptor activity in lymphocytes from normolipidaemic and familial hypercholesterolaemic (FH) subjects, and human HepG2 hepatocytes and MOLT-4 lymphoblasts.

EXPERIMENTAL APPROACH

Lymphocytes were isolated from peripheral blood, treated with different compounds, and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)-labelled LDL uptake was analysed by flow cytometry.

KEY RESULTS

Tamoxifen, toremifene and raloxifene, in this order, stimulated DiI-LDL uptake by lymphocytes by inhibiting LDL-derived cholesterol trafficking and subsequent down-regulation of LDL receptor expression. Differently to what occurred in HepG2 and MOLT-4 cells, only tamoxifen consistently displayed a potentiating effect with lovastatin in primary lymphocytes. The SERM-mediated increase in LDL receptor activity was not altered by the anti-oestrogen ICI 182 780 nor was it reproduced by 17 β -oestradiol. However, the tamoxifen-active metabolite endoxifen was equally effective as tamoxifen. The SERMs produced similar effects on LDL receptor activity in heterozygous FH lymphocytes as in normal lymphocytes, although none of them had a potentiating effect with lovastatin in heterozygous FH lymphocytes. The SERMs had no effect in homozygous FH lymphocytes.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Clinically used SERMs up-regulate LDL receptors in primary human lymphocytes. There is a mild enhancement between SERMs and lovastatin of lymphocyte LDLR activity, the potentiation being greater in HepG2 and MOLT-4 cells. The effect of SERMs is independent of oestrogen receptors but is preserved in the tamoxifen-active metabolite endoxifen. This mechanism may contribute to the cholesterol-lowering action of SERMs.