



Nutrición Hospitalaria

ISSN: 0212-1611

info@nutriciónhospitalaria.com

Grupo Aula Médica

España

Hernández, A. Gil; Ramírez Tortosa, M.^a C.; Aguilera García, M.^a C.; Mesa García, M.^a D.

Modelos experimentales de enfermedad cardiovascular

Nutrición Hospitalaria, vol. 22, núm. 2, marzo-abril, 2007, pp. 169-177

Grupo Aula Médica

Madrid, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309226715006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Revisión

Modelos experimentales de enfermedad cardiovascular

A. Gil Hernández, M.^a C. Ramírez Tortosa, M.^a C. Aguilera García y M.^a D. Mesa García

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.
Universidad de Granada. España.*

Resumen

El presente trabajo describe los modelos experimentales de utilidad clínica en el estudio de las enfermedades cardiovasculares y hace énfasis en los modelos usados para determinar los mecanismos fisiopatológicos de la aterosclerosis, así como para evaluar los efectos de productos nutricionales y farmacológicos sobre el desarrollo de este proceso inflamatorio complejo común a muchas enfermedades cardiovasculares. Se revisan los modelos animales en los que se puede inducir aterosclerosis por cambios en la composición de la dieta y los modelos animales en los que la alteración de uno o más genes (animales *knock-out* y *knock-in*), o la incorporación de genes foráneos de otras especies, da lugar a la aparición de hiperlipidemia con riesgo asociado de aparición de enfermedad cardiovascular temprana. Por otra parte, se consideran algunas de las líneas celulares más utilizadas en el estudio de los mecanismos moleculares de la aterogénesis y de evaluación de sustancias con interés nutricional o farmacológico.

(*Nutr Hosp.* 2007;22:169-77)

Palabras clave: *Animales transgénicos. Aterosclerosis. Enfermedad cardiovascular. Modelos animales. Líneas celulares.*

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) suponen la primera causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados y su incidencia aumenta progresivamente en los países en vías de desarrollo. Un gran número de enfermedades cardiovasculares, tales como la angina de pecho, el infarto de miocardio, la hiperten-

EXPERIMENTAL MODELS OF CARDIOVASCULAR DISEASE

Abstract

The present work describes clinically useful experimental models for the study of cardiovascular disease and emphasizes the models used to determine the pathophysiologic mechanisms of atherosclerosis, as well as to evaluate the effects of nutritional and pharmacological products on the development of this complex inflammatory process present in many cardiovascular diseases. Animal models in which atherosclerosis may be induced by dietary changes are reviewed, as well as those in which modification in one or more genes (*knock-out* and *knock-in* animals), or the incorporation of foreign genes from other species lead to early cardiovascular disease. On the other hand, some of the cell lines most frequently used in studying molecular mechanisms of atherosclerosis and assessment of substances with nutritional or pharmacological interest are considered.

(*Nutr Hosp.* 2007;22:169-77)

Key words: *Transgenic animals transgénicos. Atherosclerosis. Cardiovascular disease. Animal models. Cellular lines.*

sión arterial y la enfermedad vascular periférica tienen su origen en la aparición de aterosclerosis. Este término se aplica a diversos tipos de procesos inflamatorios que producen una lesión proliferativa de las capas íntima y media arterial tras la formación de capas fibroadiposas, que terminan por invadir la luz de las arterias y, en combinación con procesos trombóticos, comprometen la funcionalidad circulatoria de estos vasos. La aterosclerosis se caracteriza por la existencia de placas fibroadiposas elevadas en la íntima arterial (ateromas) especialmente en la aorta, coronarias y arterias cerebrales, que producen estenosis (estrechamiento de la luz del vaso).

Existen numerosos modelos experimentales de aterosclerosis que utilizan animales a los que se les induce la enfermedad mediante la ingesta de dietas con composición alterada, especialmente de los lípidos¹⁻³.

Correspondencia: Ángel Gil Hernández
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II
Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos
Ramón y Cajal, 4
18071 Granada
E-mail: agil@ugr.es

Recibido: 2-XI-2006.
Aceptado: 9-XI-2006.

Asimismo, se han desarrollado animales modificados genéticamente por alteración de uno o más genes, o por transgénesis de genes alterados de la especie humana que dan lugar a la aparición de hiperlipidemias y que finalmente conducen a la aparición de ECV⁴⁻⁵ (tabla I). Finalmente, existen varios modelos celulares utilizados en el estudio de la ECV, especialmente para evaluar los efectos de agentes pro- y antiaterogénicos, así como de los mecanismos moleculares por los cuales estos agentes ejercen dichos efectos⁶⁻⁹.

El objetivo del presente trabajo es ofrecer una panorámica general de los diferentes modelos utilizados para el estudio de la aterosclerosis y de la ECV de utilidad clínica, especialmente en el campo de la nutrición.

Modelos animales

Son muchos los animales de laboratorio que se han utilizado para estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo de la aterosclerosis. Entre ellos podemos citar el mono¹⁰, el cerdo¹¹⁻¹², el hamster, el conejo y el pollo¹³⁻¹⁴ y muy recientemente el conejillo de Indias¹⁵. De todos ellos, son los dos primeros los que generan lesiones patológicas en las arterias elásticas (aorta, carótida e ilíacas) similares a las humanas, en donde es frecuente el desarrollo de engrosamientos intinales adaptativos, difusos y excéntricos, como consecuencia del estrés mecánico y físico del flujo sanguíneo sobre las paredes arteriales, principalmente en las zonas de bifurcación o salida de ramas secundarias. Sin embargo, el gran problema para los laboratorios es su coste

y el no disponer de la infraestructura necesaria para el mantenimiento de dichos animales al alcance de los grupos de investigación. Por ello, hoy día el modelo experimental de aterosclerosis más extendido es el conejo¹⁶. La tabla I resume los principales modelos animales utilizados para el estudio de las ECV.

En general, uno de los problemas principales es que en la mayoría de los modelos, excepto el mono, el cerdo y el conejo de Indias, en la distribución y composición de las lipoproteínas son muy diferentes a las de la especie humana. La figura 1 representa los porcentajes de distribución de colesterol en las lipoproteínas plasmáticas de humanos y de distintas especies animales utilizadas para el estudio de las ECV.

El primer estudio sobre aterosclerosis realizado con conejos data de 1908¹⁷. En dicho estudio las lesiones ateromatosas fueron inducidas por la dieta. Debido a que el conejo es muy sensible a la inducción de las lesiones ateromatosas mediante una dieta rica en colesterol, este es el modelo más extendido en la literatura para estudiar la aterosclerosis. Diferentes cantidades de colesterol en la dieta, combinadas o no con distintas grasas comestibles, así como distintos tiempos de duración, han sido y son utilizados para provocar diferentes tipos de lesiones ateromatosas. Existen estudios donde el periodo de intervención varía según la cantidad de colesterol administrada a los conejos, por ejemplo; Zulli y cols.¹⁸ desarrollaron placas de aterosclerosis con 0,5% de colesterol durante 12 semanas; Pfister¹⁹ durante 3 semanas con la misma cantidad de colesterol; Zhang y cols.²⁰ provocaron aterosclerosis con 1% de colesterol durante 12 semanas; Ozer y cols.²¹ con 2% de colesterol durante 4 semanas; y Shakuto y cols.²² con un 1% de colesterol durante 10 semanas. Existen otros estudios, entre los que se incluyen los realizados por nuestro equipo de investigación, en los que se combina el tiempo de tratamiento, la ingesta de colesterol y grasa saturada. Así, Juzwłak y cols.²³ han desarrollado aterosclerosis en conejos mezclando 0,5 g/kg de grasa saturada más 0,5 g/kg de colesterol durante 12 semanas. Nuestro equipo de investigación provoca la aparición y desarrollo de estría grasa en conejos con la ingesta de colesterol al 1,5% junto a grasa

Tabla I
Principales modelos animales utilizados para el estudio de la aterosclerosis

- **Aterosclerosis inducida por la dieta**
No modificados genéticamente
Ingesta elevada de colesterol y grasa saturada: conejo, hamster, pollo, cerdo, mono
Modificados genéticamente
 - Conejos New Zealand que expresan Apo A-1, sobreexpresión de lecitín-colesterol-acil-transferasa, lipasa hepática humana, o Apo B-100 humana
 - Conejos WHHL que expresan Lp(a) humana
- **Transgénicos *knock-out* y *knock in***
Ratones C57BL/6
apoE *knock-out* (apoE^{-/-})
knockout para el receptor LDL (LDL^{-/-})
ratones doble *knock-out* apoE y LDL-R
knock-in que expresan la apoE2 humana, apoE2k o apoE3-Leiden
- **Cepas murinas con defectos en la función plaquetaria**
- **Cepas murinas y pollos con mutaciones en los transportadores A1 dependientes de unión a ATP**
ABCA1 —ATP-binding cassette transporter A1—.

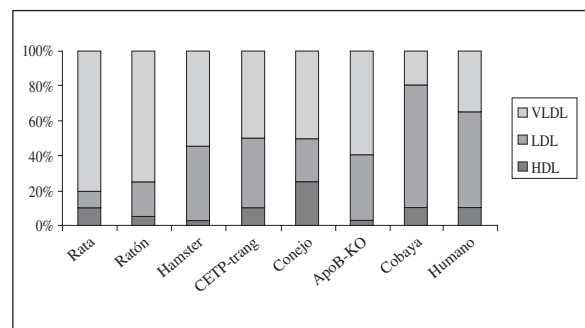


Fig. 1.—Distribución de colesterol en las lipoproteínas de varios modelos animales y del humano. Modificado de Fernández y Volek (2006)¹⁵.

saturada al 3% (manteca de cerdo) durante 4 semanas, y placas de ateroma a las 8 semanas²⁴⁻²⁶. El desarrollo de ateromatosis en las aortas de los conejos es tiempo dependiente. Así, en los primeros 10 d, sólo se observaron depósitos mínimos de macrófagos cargados de lípidos en la íntima del cayado (aorta torácica ascendente). Estos depósitos se hicieron más abundantes y grandes a los 20 d en la misma porción de la aorta, empezando a aparecer nuevos acúmulos en la aorta torácica descendente y abdominal, pero no de forma tan intensa. A los 30 d, los conejos desarrollaron una ateromatosis marcada, representada principalmente por depósitos de macrófagos en la íntima (estría grasa) a lo largo de todo el trayecto de la aorta²⁴⁻²⁶ (fig. 2). En cuanto al desarrollo de verdadera placa fibroateromatosa, ésta se apreció en todas las fracciones correspondientes a cayado, aorta torácica y aorta abdominal cuando la ingesta de colesterol y grasa saturada se mantuvo hasta los 50 días^{1,27-28} (fig. 3).

Otra forma de inducir la aterosclerosis, distinta de la administración en la dieta con diferentes tipos de grasa, es mediante la producción de un daño mecánico a nivel intraluminal en la arteria, lo que da lugar a una respuesta proliferativa a nivel endotelial que está de acuerdo con la patofisiología del proceso aterosclerótico^{3,29-30}.

Finalmente, hay que destacar el uso actual de modelos de conejos modificados genéticamente para estudiar mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la enfermedad inducida por la dieta. Entre los relacionados con la aterosclerosis encontramos la cepa de conejo New Zealand que expresa apo A-1 humana, otros modelos que sobreexpresan la lecitín-colesterol-acil transferasa, la lipasa hepática, o la apo B-100 humanas, o bien la cepa de conejos WHHL que expresan la Lp(a) humana consiguiendo lesiones ateromatosas muy avanzadas y similares a las de los humanos^{16,31} (tabla I).

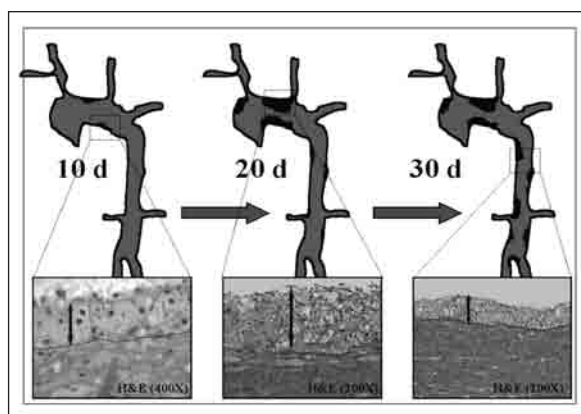


Fig. 2.—Inducción de estrías grasas y placas de ateroma en aorta de conejos alimentados con una dieta rica en colesterol (1,5%) y manteca de cerdo (3%) durante 10, 20 y 30 días. Nótese el incremento progresivo, en número y tamaño de los depósitos, en las diferentes partes de la aorta en relación con el tiempo (Hematoxilina-eosina, x200). Las flechas definen el grosor de la placa. Tomado de Aguilera y cols. (2002)²⁸.

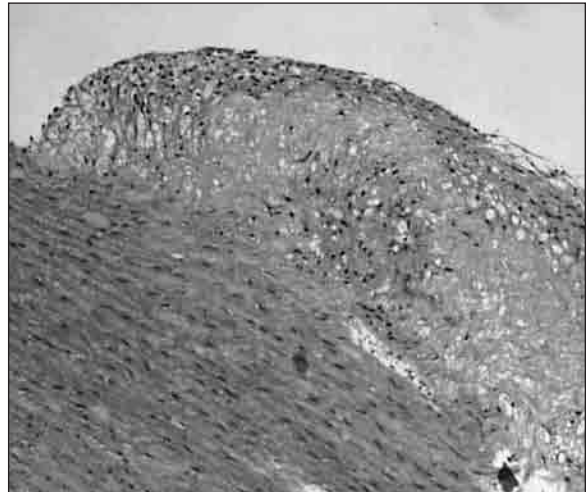


Fig. 3.—Desarrollo de placa fibrosa en aortas de conejos ateroescleróticos. (hematoxilina-eosina, x100). Tomado de Aguilera y cols. (2002)²⁸.

Las dietas con restricción de hidratos de carbono conducen a la reducción de triglicéridos (TG), aumentan la fracción de colesterol asociado a las lipoproteínas de elevada densidad (HDL-colesterol) y promueven la formación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) más grandes y menos aterogénicas en la especie humana. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a este tratamiento no han sido explorados debido a la falta de un modelo apropiado. Recientemente, se ha indicado que el conejo de Indias puede ser un modelo adecuado para el estudio de los fenómenos de aterogénesis y de la reducción de TG con dietas con bajo contenido en hidratos de carbono, ya que en estos animales, como ocurre en el hombre, la mayor parte del colesterol está asociado a las LDL, y tienen proteína de transferencia de ésteres de colesterol y lipoproteína lipasa¹⁵.

Animales modificados genéticamente

Actualmente existen una serie de modelos animales que desarrollan aterosclerosis y enfermedad cardiovascular por alteración de uno o más genes (tablas I y II).

En los animales denominados *knock-out* se ha alterado un gen de interés. Para ello se transfiere el gen mutado a un cultivo de células madre y luego algunas de estas células se inoculan a blastocitos que son trasplantados a hembras huésped. En los animales denominados *knock-in* se reemplaza un gen por otro y se evalúan los efectos funcionales que esta manipulación genética causa. En los animales denominados *transgénicos* se inserta un segmento de ADN de una especie exógena, mediante la inyección del ácido nucleico exógeno en el pronúcleo de una célula embrionaria. El embrión es trasplantado a una hembra huésped y el animal que se desarrolla a partir de ese embrión es un transgénico.

Tabla II
Características de ratones transgénicos que expresan niveles y formas mutadas diferentes de ApoE

Modificación genética	Promotor	Dieta Chow	Dieta HGC				
		apoE (mg/dl)	Col	TG	Col	TG	
C57B16 (control)	n.d.	100% (5 mg/dl)	2,1	0,5	15/1,0/0,5	5,7	0,1
Gen diana							
ApoE <i>knock-out</i> (heterozigoto)	n.d.	50%	3,1	0,3	15/1.0/0.5	10,1	n.d.
ApoE <i>knock-out</i>	n.d.	0%	19	0,4	15/1,0/0,5	102	n.d.
ApoE3 <i>knock-in</i> humana	ApoE raton	1,3	4,4	0,84	16/1,25/0,05	9,0	0,3
Ratones transgénicos							
ApoE rata	Metalotioneina	17	1,4	0,2	5/1,0/0,5	2,4	n.d.
ApoE2 humana	Endógeno	0,9	2,1	0,6	15/1,0/0,5	6,8	0,1
ApoE2 humana	Endógeno	9,2	16,5	2,4	–	n.d.	n.d.
ApoE <i>knock-out</i>							
ApoE2 humana	Endógeno	53	3,9	0,5	–	n.d.	n.d.
ApoE2 humana	ApoA1	23	2,1	0,8	15/1,0/0,5	5,5	0,4
ApoE2 (142)	Endógeno	70	7,9	4,3	16/1,0/0,5	12,6	1,3
ApoE3 Leiden	Endógeno	2,7	2,7	0,8	15/1,0/0,5	13,7	0,2
ApoE3 Leiden	Endógeno	36	3,2	2,7	15/1,0/0,5	40	16
ApoC1							

Col: Colesterol; HGC: Hidratos de carbono / Grasa / Colato; nd: no disponible; TG: Triglicéridos.

Los ratones C57BL/6 son los más susceptibles de desarrollar aterosclerosis y es, por tanto, la variedad de elección para ser genéticamente manipulada con el fin de desarrollar modelos de aterosclerosis. Los ratones *apoE knock-out* (*apoE*^{-/-}) en los que se ha delecionado el gen que codifica para la apolipoproteína E, constituyente fundamental de diversos tipos de lipoproteínas, desarrollan hiperlipidemia y aterosclerosis tanto con dieta normal como con dieta rica en grasa, aunque la severidad del fenotipo depende de la variedad de ratón utilizada⁴. Éste ha sido el modelo de aterosclerosis más estudiado y mejor caracterizado; se usa frecuentemente como base para el estudio del papel de otros genes en el desarrollo de la aterosclerosis por manipulaciones genéticas adicionales. Desafortunadamente, los ratones *apoE*^{-/-} no son un modelo fidedigno de la aterosclerosis humana, ya que el perfil de lipoproteínas en estos ratones difiere significativamente del de los pacientes humanos y la ausencia de *apoE* es una condición muy rara en la especie humana⁵ (tabla II).

Otro modelo de aterosclerosis es el ratón *knock-out* para el receptor LDL (*LDL*^{-/-}). La deficiencia de estos receptores provoca una hipercolesterolemia menos severa que en el caso de los ratones *knock-out* para la *apoE*, pero una dieta rica en grasa provoca el desarrollo de hipercolesterolemia y aterosclerosis. Este tipo de animales es particularmente susceptible a la dieta,

ya que pequeños cambios en su composición son suficientes para modificar el fenotipo aterosclerótico. Otra ventaja de este modelo es que la deficiencia del receptor de LDL es un fenotipo encontrado en los humanos con cierta frecuencia⁶.

En la última década se ha desarrollado un nuevo modelo de ratones doble *knock-out* *apoE* y *LDL-R*, que desarrollan una hiperlipidemia más severa y una aterosclerosis mayor que el modelo deficiente solo en *apoE*, en este caso también acelerado por una dieta rica en grasa³³.

Otro tipo de modelo murino de aterosclerosis está basado en un método de reemplazamiento génico conocido como *knock-in* en el que en lugar de eliminar, un gen determinado este, es reemplazado por una variante del gen en la misma localización del genoma. Los ratones *knock-in* que expresan la *apoE2* humana muestran un perfil plasmático lipoproteico similar al de los sujetos hiperlipidémicos tipo III, que tienen un menor aclaramiento de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y por tanto desarrollan aterosclerosis a pesar de una dieta normal³⁴.

Además de los modelos *knock-out* o de eliminación dirigida de un gen concreto, hay un gran número de modelos transgénicos. La mayoría de los modelos transgénicos para la aterosclerosis consisten en la introducción del gen humano de la *apoE* o bien de una forma mutada, como es la *apoE2k* o *apoE3-Leiden*³⁵⁻³⁷

(fig. 4). Un gran número de isoformas de apo E han sido expresadas en ratones para estudiar la influencia de las mismas sobre el desarrollo de aterosclerosis³². Estos modelos tienen un gran potencial ya que responden muy bien tanto a factores dietéticos como a agentes farmacológicos.

Por otra parte, en años recientes, la disponibilidad de cepas murinas con defectos en la función plaquetaria y el desarrollo de modelos *in vivo* para determinar los procesos fisiológicos y patofisiológicos relacionados con la aterosclerosis ha abierto nuevos caminos para identificar el papel individual de las proteínas de las plaquetas en la adhesión, activación, agregación, secreción y actividad procoagulante³⁸.

Las mutaciones en los transportadores A1 dependientes de unión a ATP (ABCA1 -*ATP-binding cassette transporter A1*-) dan lugar a la aparición de la enfermedad de Tangier en la que se acumulan ésteres de colesterol en los tejidos y los niveles plasmáticos de HDL están muy bajos, lo cual aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular. Estos transportadores desempeñan un papel crucial en el tráfico celular de fosfolípidos y de colesterol. Recientemente se han desarrollado modelos *knock-out* para este transportador tanto en ratones como en pollos que desarrollan la sintomatología de la enfermedad de Tangier. Asimismo, se han obtenido animales transgénicos con el gen humano normal que restauran el metabolismo del colesterol en dichos mutantes³⁹.

En cualquier caso, después de una década de desarrollo de modelos animales con alteraciones génicas, está claro que cada uno de ellos tiene sus fortalezas y sus debilidades, particularmente cuando se evalúan los efectos de la nutrición y de los fármacos hipolipemiantes.

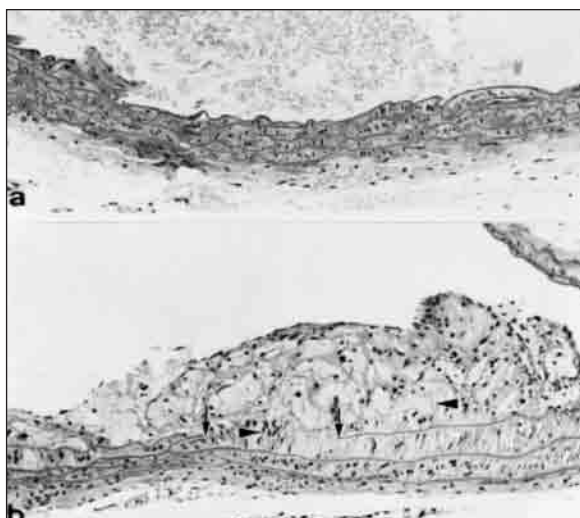


Fig. 4.—Aterosclerosis en ratones con ApoE de Leiden. A: Control; b: Experimental Tomado de Wouters y cols. (2005)³⁶.

Modelos celulares

En el desarrollo de la aterosclerosis participan numerosos tipos celulares entre los que se encuentran macrófagos, células del endotelio vascular, linfocitos, células del músculo liso, así como de las plaquetas. Utilizando líneas inmortalizadas de estas células de forma independiente o en co-cultivo se pueden evaluar muchas de las alteraciones que ocurren durante el desarrollo de la placa de ateroma, especialmente de los acontecimientos que ocurren a nivel celular y molecular, cuando se exponen a diferentes agentes tóxicos. Asimismo, una vez inducido el daño celular se puede evaluar la influencia de diferentes agentes farmacológicos o dietéticos, por ejemplo antioxidantes, sobre la aparición de marcadores moleculares de daño celular asociados a la aterosclerosis. En la tabla III se resumen las características principales de las líneas celulares más utilizadas para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las ECV.

La línea celular THP-1 procede de un paciente con leucemia monocítica aguda. Estas células expresan marcadores característicos de los monocitos y poseen receptores Fc y C3b, sin embargo, no expresan inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas. Están caracterizadas por su capacidad fagocítica y por la producción de lisozimas y esterasa, además de por su capacidad para restaurar la respuesta de los linfocitos T a la concavalina A⁴⁰. Al tratar las THP-1 con 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA) se observa adherencia a las superficies de cristal, a la vez que exhiben características morfológicas similares a los macrófagos⁴¹. Además, poseen la capacidad de acumular lípidos, procedentes de las LDL, en su interior, y de expresar en su superficie el receptor para las LDL acetiladas, la apolipoproteína E y la lipoproteína lipasa⁴², así como el receptor para las VLDL⁴³, todos ellos considerados marcadores diferenciadores de los macrófagos. Por estos motivos, estas células activadas con PMA han sido ampliamente utilizadas para el estudio *in vitro* de la formación de células espumosas y de la aterosclerosis⁷.

Sin embargo, existen diferencias fundamentales entre las células monocíticas y las THP-1. En primer lugar, los monocitos humanos sufren apoptosis cuando no son estimulados por determinadas citoquinas, mientras que las THP-1 crecen indefinidamente. En segundo lugar, existe una heterogeneidad celular en cuanto a la expresión de algunos receptores. Incluso, se ha observado que pueden perder la diferenciación cuando se cultivan por un tiempo excesivo, hecho que no les ocurre a los macrófagos. Por otro lado, se ha observado que tras su activación, las THP-1 segregan factor de crecimiento transformante β (TGF)- β 1, que inhibe la actividad de los receptores scavenger para las LDL acetiladas⁴⁴. Además, en las células activadas tampoco se observa la expresión del receptor hepático característico de los macrófagos⁷. Concretamente, se ha caracterizado el perfil de expresión genética de es-

Tabla III
Principales modelos celulares utilizados para el estudio de las ECV

Macrófagos

Línea celular THP-1

- Expresan marcadores característicos de los monocitos y poseen receptores Fc y C3bN.
- No expresan inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas.
- Tienen capacidad fagocítica y producen lisozimas y esterasa.
- Restauran la respuesta de los linfocitos T a la concavalina A.

Al tratar las THP-1 con 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA):

- Se observa adherencia a las superficies de cristal, a la vez que exhiben características morfológicas similares a los macrófagos.
- Acumulan lípidos procedentes de las LDL, en su interior, y expresan en su superficie el receptores diferenciadores de los macrófagos.

Cocultivo de THP-1 con células del músculo liso (SMC) y células aórticas endoteliales

Es adecuado para el estudio de los mecanismos moleculares y celulares implicados en la formación de células espumosas durante los primeros estadios de la aterosclerosis.

Línea celular U937

- Capacidad para producir lisozimas y elevada actividad esterasa.
- Expresan receptores para las LDL en cantidad relativamente elevada, y para las LDL acetiladas en menor cantidad.
- Poseen varios antígenos de superficie comunes con los monocitos sanguíneos, como por ejemplo el antígeno OKM1, 4F2 y T4.

La estimulación de las U937 con metabolitos segregados por linfocitos T tratados con concavalina A, provoca:

- Incremento de OKM1 y de la actividad del receptor Fc y disminuye la expresión del antígeno T4, hecho característico de la maduración fenotípica de las células.

Células endoteliales.

Células del músculo liso.

tas células, comparándolo con el de los monocitos y macrófagos y se ha demostrado que los monocitos son bastante diferentes a las células THP-1 no estimuladas. Sin embargo, al comparar con los macrófagos, las THP-1 activadas con PMA comparten la expresión de algunos, aunque no todos, genes característicos⁷. Todos estos datos sugieren que, aunque el uso de esta línea celular es adecuado para el estudio *in vitro* de los mecanismos moleculares de las enfermedades cardiovasculares, requieren una rigurosa interpretación de los resultados.

Los cultivos celulares con THP-1 han sido ampliamente utilizados para el estudio de múltiples mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la aterosclerosis. Entre ellos, se ha estudiado receptores de membrana para distintas partículas como las HDL⁴⁵, procesos de activación e inhibición de proliferación celular⁴⁶, la expresión de metaloproteasas y de algunas moléculas que pueden modular su expresión y/o actividad⁸, el metabolismo de moléculas de adhesión y citoquinas, así como los mecanismos nucleares activados a través de las LDL oxidadas durante el desarrollo de la aterosclerosis⁶.

Por otro lado, existen varios estudios en los que se cultivan conjuntamente varios tipos de células carac-

terísticas de las lesiones ateroscleróticas, con el fin de estudiar los mecanismos moleculares de sus interacciones durante la formación de la placa de ateroma. Takaku y cols.⁴⁷ demostraron que el cocultivo de THP-1 con células del músculo liso (SMC) y células aórticas endoteliales es adecuado para el estudio de los mecanismos moleculares y celulares implicados en la formación de células espumosas durante los primeros estadios de la aterosclerosis. Incluso se ha estudiado el efecto de mediadores producidos por células mononucleares aisladas de sangre periférica sobre la producción del receptor CD36 en THP-1⁶.

La línea celular U937 procede de un linfoma histiocítico difuso de un humano caucasiano; las células de tipo histiocítico exhiben características semejantes a los monocitos. Las U937 se caracterizan por su capacidad para producir lisozimas y por su gran actividad esterasa⁴⁸. Estas células expresan receptores para las LDL en cantidad relativamente elevada, y para las LDL acetiladas en menor cantidad⁴⁹. Además, poseen varios antígenos de superficie comunes con los monocitos sanguíneos, como por ejemplo el antígeno OKM1, 4F2 y T4⁵⁰. La estimulación de las U937 con metabolitos segregados por linfocitos T tratados con concavalina A, provoca un incremento de OKM1 y de

la actividad del receptor Fc, a la vez que disminuye la expresión del antígeno T4, hecho característico de la maduración fenotípica de las células monocíticas⁵⁰. La diferenciación de estas células provoca cambios morfológicos y funcionales bastante marcados, incrementando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos frente a las células tumorales. Al igual que los macrófagos, una vez diferenciada, esta línea celular tiene capacidad para reconocer y captar LDL nativas o acetiladas⁵¹. La diferenciación de U937 con PMA induce la supresión de la transcripción de catepsina G y colágeno, mientras que incrementa la segregación de metaloproteasas, hechos característicos de las células monocíticas⁵², mecanismos que todavía están siendo estudiados⁵³. Sin embargo, las U937 activadas no son capaces de expresar los antígenos HLA-DR que sí son inducidos en los macrófagos⁵⁴. Recientemente se han descrito algunos factores de transcripción implicados en los procesos de proliferación, apoptosis, ubiquitinación e integridad estructural, junto con otros factores implicados en la respuesta inflamatoria y del sistema inmune, lo que proporciona información clave para el estudio de los mecanismos patofisiológicos de la aterosclerosis⁵⁵.

Muchos son los trabajos con este tipo de células que han contribuido a un mayor conocimiento de las enfermedades cardiovasculares. Respecto a los procesos de maduración de los monocitos, las U937 se han utilizado para la determinación de mecanismos implicados en la modulación de procesos de activación y migración, como por ejemplo la hemoxigenasa 1 que podría constituir un novedoso mecanismo antiaterogénico⁵⁶. En relación a las implicaciones de las LDL en la formación de la placa de ateroma, las U937 se han utilizado para el estudio de los mecanismos de oxidación mediados por células⁵⁷, de captación de los lípidos sanguíneos y de expresión de receptores característicos de estos procesos⁵⁸. Existen trabajos con U937 que han descrito algunos mecanismos de formación de células espumosas⁵⁹ y la liberación de moléculas una vez que estas células están cargadas de grasa y transformadas⁶⁰. Cabe destacar que los trabajos con U937 contribuyeron a determinar el papel fundamental de los procesos inflamatorios, como la liberación de citoquinas proinflamatorias, en el desarrollo de la aterosclerosis⁶¹.

Por otro lado, esta línea celular se ha empleado en co-cultivos con células endoteliales, evidenciando la mayor adherencia de las células monocíticas en presencia de LDL⁶², así como algunos mecanismos anti-aterogénicos relacionados con la prevención de estos procesos. Entre éstos encontramos trabajos recientes que muestran un posible mecanismo preventivo de las HDL a través de la lipasa endotelial y los activadores nucleares PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor*).

La aterosclerosis tiene lugar preferentemente en áreas de flujo sanguíneo turbulento, mientras que el flujo laminar se comporta como ateroprotector. La citoquinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), estimulan la expresión

de varios genes que pueden promover la aterosclerosis en las células endoteliales. Para estudiar los efectos del flujo y de las citoquinas proinflamatorias, así como de agentes nutricionales de carácter antiinflamatorio, se utilizan con ventaja las células humanas de cordón umbilical, denominadas HUVEC^{63,64}.

Referencias

1. Aguilera MC, Ramírez-Tortosa CL, Quiles JL, Yago MD, Martínez-Burgos MD, Martínez-Victoria E, Gil A, Ramírez-Tortosa MC. Monounsaturated and n-3 but not n-6 polyunsaturated fatty acids improve hepatic fibrosis in hypercholesterolemic rabbits. *Nutrition* 2005; 21: 363-371.
2. McMahon AC, Kritharides L, Lowe HC. Animal models of atherosclerosis progression: current concepts. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; 5: 433-440.
3. Wu X, Wang J, Fan J, Chen M, Chen L, Huang W, Liu G. Localized vessel expression of lipoprotein lipase in rabbits leads to rapid lipid deposition in the balloon-injured arterial wall. *Atherosclerosis* 2006; 187: 65-73.
4. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; 258: 468-471.
5. Fazio S, Linton MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci* 2001; 6: D515-525.
6. Kavanagh IC, Symes CE, Renaudin P, Nova E, Mesa MD, Boukourvalas G, Leake DS, Yaqoob P. Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPARgamma, but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis* 2003; 168: 271-282.
7. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb* 2004; 11: 88-97.
8. Ozaki H, Miyashita Y, Watanabe H, Shirai K. Enhancement of MMP-9 activity in THP-1 cells by 7-ketocholesterol and its suppression by the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12: 308-314.
9. Ahmed W, Orasanu G, Nehra V, Asatryan L, Rader DJ, Ziouzenkova O, Plutzky J. High-density lipoprotein hydrolysis by endothelial lipase activates PPARalpha: a candidate mechanism for high-density lipoprotein-mediated repression of leukocyte adhesion. *Circ Res* 2006; 98: 490-498.
10. Noa M, Mas R. Protective effect of polyicosanol on atherosclerotic plaque on aortas I monkeys. *Arch Med Res* 2005; 36: 441-447.
11. Gambillara V, Chambaz C, Roy S, Stergiopoulos N, Silacci P. Plaque-prone hemodynamic impairs endothelial function in pig carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 2320-2328.
12. West KL, Fernández ML. Guinea pigs as models to study the hypocholesterolemic effects of drugs. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22: 55-70.
13. García-Pérez B, Ayala I, Castells MT, Doménech G, Sánchez-Polo MT, García-Partida P, Valdés M. Effects of nifedipine, verapamil and diltiazem on serum biochemical parameters and aortic composition of atherosclerosis chickens. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 1-7.
14. Himmelfarb J. Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial* 2004; 17: 449-454.
15. Fernández ML, Volek JS. Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond)* 2006; 27: 17 (E on-line).
16. Yanni AE. The laboratory rabbits: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory Animals* 2004; 38: 246-256.
17. Ignatowski AI. Influence of animal food on the organism of rabbits. *ST Petersburg Izvest Imp Voenno-Med Akad* 1908; 16: 154-176.

18. Zulli A, Buxton BF, Black MJ, Hare DL. CD34 Class III positive cells are present in atherosclerotic plaques of the rabbit model of atherosclerosis. *Histochem Cell Biol* 2005; 124: 517-522.
19. Pfister SL. Aortic thromboxane receptor deficiency alters vascular reactivity in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2006; 1 (in press).
20. Zhang ZS, Jame AE, Huang Y, Ho Wk, Sabota DS, Chen ZY. Quantification and characterization of aortic cholesterol in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Int J Food Sci Nutr* 2005; 56: 359-366.
21. Ozer NK, Negis Y, Aytan N, Villacorta L, Ricciaralli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* 2006; 184: 15-20.
22. Shakuto S, Oshima K, Tsuchiya E. Glimepiride exhibits prophylactic effect on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2005; 182: 209-217.
23. Juzwiak S, Wojcicki J, Mokrzycki K, Marchlewicz M, Bialecka M, Wenda-Rozewicka L, Gawronska-Szklarz B, Drozdziak M. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol Rep* 2005; 57: 604-609.
24. Mesa MD, Aguilera CM, Ramírez-Tortosa CL, Ramírez-Tortosa MC, Quiles JL, Baro L, Martinez de Victoria E, Gil A. Oral administration of a turmeric extract inhibits erythrocyte and liver microsome membrane oxidation in rabbits fed with an atherogenic diet. *Nutrition* 2003; 19: 800-804.
25. Quiles JL, Mesa MD, Ramírez-Tortosa CL, Aguilera CM, Battino M, Gil A, Ramírez-Tortosa MC. Curcuma longa extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1225-1231.
26. Ramírez-Tortosa MC, Mesa MD, Aguilera MC, Quiles JL, Baro L, Ramírez-Tortosa CL, Martínez-Victoria E, Gil A. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effect in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999; 147: 371-378.
27. Aguilera CM, Mesa MD, Ramírez-Tortosa MC, Quiles JL, Gil A. Virgin oil and fish oils enhance the hepatic antioxidant defence system in atherosclerotic rabbits. *Clin Nutr* 2003; 22: 379-384.
28. Aguilera CM, Ramírez-Tortosa MC, Mesa MD, Ramírez-Tortosa CL, Gil A. Sunflower, virgin olive and fish oils differentially affect the progression of aortic lesions in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 162: 335-344.
29. Worth NF, Berry CL, Thomas AC, Campbell JH. SI8886 a selective TP receptor antagonist, inhibits development of atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 2005; 183: 65-73.
30. Liu Q, Chen ZQ, Bobustuc GC, McNatt JM, Segall H, Pan S, Willerson JT, Zoldhelyi P. Local gene trasduction of cyclooxygenase 1 increases blood flow in injured atherosclerosis rabbit arteries. *Circulation* 2005; 111; 1833-1840.
31. Bosze Z, Hiripi L, Carnwath JW, Niemann H. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic Research* 2003; 12: 541-553.
32. Sullivan PM, Mezdour H, Aratani Y, Knouff C, Najib J, Reddick RL, Quarfordt SH, Maeda N. Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 17972-17980.
33. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knock-out" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4431-4435.
34. Sullivan PM, Mezdour H, Quarfordt SH, Maeda N. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *J Clin Invest* 1998; 102: 130-135.
35. Van den Maagdenberg AM, Hofker MH, Krimpenfort PJ, De Bruijn I, Van Vlijmen B, Van der Boom H, Havekes LM, Frants RR. Transgenic mice carrying the apolipoprotein E3-Leiden gene exhibit hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem* 1993; 268: 10540-10545.
36. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, Van Gorp PJ, Van Bilsen M, Hofker MH. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43:470-479.
37. Hofker MH, Van Vlijmen BJ, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 137: 1-11.
38. Nieswandt B, Aktas B, Moers A, Sachs UJ. Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1725-1736.
39. Srivastava N. ATP binding cassette transporter A1 —key roles in cellular lipid transport and atherosclerosis. *Mol Cell Biochem* 2002; 237: 155-164.
40. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26: 171-176.
41. Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 1982; 42: 1530-1536.
42. Tajima S, Hayashi R, Tsuchiya S, Miyake Y, Yamamoto A. Cells of a human monocytic leukemia cell line (THP-1) synthesize and secrete apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 126: 526-531.
43. Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y, Yamamoto T. Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 2173-2182.
44. Nishimura N, Harada-Shiba M, Tajima S, Sugano R, Yamamura T, Qiang QZ, Yamamoto A. Acquisition of secretion of transforming growth factor-beta 1 leads to autonomous suppression of scavenger receptor activity in a monocyte-macrophage cell line, THP-1. *J Biol Chem* 1998; 273: 1562-1567.
45. Kurata H, Matsumoto A, Fujiwara Y, Kondo K, Itakura H, Mitchell A, Fidge N. A candidate high density lipoprotein (HDL) receptor, HB2, with possible multiple functions shows sequence homology with adhesion molecules. *J Atheroscler Thromb* 1998; 4: 112-117.
46. Ogru E, Libinaki R, Gianello R, West S, Munteanu A, Zingg JM, Azzi A. Modulation of cell proliferation and gene expression by alpha-tocopheryl phosphates: relevance to atherosclerosis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1031: 405-411.
47. Takaku M, Wada Y, Jinnouchi K, Takeya M, Takahashi K, Usuda H, Naito M, Kurihara H, Yazaki Y, Kumazawa Y, Okimoto Y, Umetani M, Noguchi N, Niki E, Hamakubo T, Kodama T. An *in vitro* coculture model of transmigrant monocytes and foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2330-2339.
48. Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565-577.
49. Esfahani M, Scerbo L, Lund-Katz S, DePace DM, Maniglia R, Alexander JK, Phillips MC. Effects of cholesterol and lipoproteins on endocytosis by a monocyte-like cell line. *Biochim Biophys Acta* 1986; 889: 287-300.
50. Moscicki RA, Amento EP, Krane SM, Kurnick JT, Colvin RB. Modulation of surface antigens of a human monocyte cell line, U937, during incubation with T lymphocyte-conditioned medium: detection of T4 antigen and its presence on normal blood monocytes. *J Immunol* 1983; 131: 743-748.
51. Berg KA, Berry ML, Sapareto SA, Petty HR. Fluorescence studies of macrophage recognition and endocytosis of native and acetylated low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1986; 887: 304-314.
52. Shapiro SD, Campbell EJ, Senior RM, Welgus HG. Proteinases secreted by human mononuclear phagocytes. *J Rheumatol Suppl.* 1991; 27: 95-98.
53. Shokawa T, Yoshizumi M, Yamamoto H, Omura S, Toyofuku M, Shimizu Y, Imazu M, Kohno N. Induction of heme oxygenase

- nase-1 inhibits monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in U937 cells. *J Pharmacol Sci* 2006; 100: 162-166.
54. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Effect of C-reactive protein on vascular cells: evidence for a proinflammatory, proatherogenic role. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 33-37.
 55. Koren HS, Anderson SJ, Larrick AW. *In vitro* activation of a human macrophage-like cell line. *Nature* 1979; 279: 328-331.
 56. Lim WC, Chow VT. Gene expression profiles of U937 human macrophages exposed to *Chlamydia pneumoniae* and/or low density lipoprotein in five study models using differential display and real-time RT-PCR. *Biochimie* 2006; 88: 367-377.
 57. Frostegard J, Regnstrom J, Tornvall P, Hamsten A, Nilsson J. The susceptibility of low density lipoprotein to chemical oxidation is closely related to proneness to biological modification. *Free Radic Res* 1995; 23: 581-592.
 58. Grewal T, Bartlett A, Burgess JW, Packer NH, Stanley KK. Desialylated LDL uptake in human and mouse macrophages can be mediated by a lectin receptor. *Atherosclerosis* 1996; 121: 151-163.
 59. Fu T, Borensztajn J. Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochem J* 2002; 366: 195-201.
 60. Hammad SM, Taha TA, Nareika A, Johnson KR, Lopes-Virella MF, Obeid LM. Oxidized LDL immune complexes induce release of sphingosine kinase in human U937 monocytic cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006; 79: 126-140.
 61. Maziere JC, Maziere C. Inflammation cytokines and peroxidation of low density lipoproteins (LDL). *C R Seances Soc Biol Fil* 1995; 189: 811-825.
 62. Frostegard J, Wu R, Haegerstrand A, Patarroyo M, Lefvert AK, Nilsson J. Mononuclear leukocytes exposed to oxidized low density lipoprotein secrete a factor that stimulates endothelial cells to express adhesion molecules. *Atherosclerosis* 1993; 103: 213-219.
 63. Yoshizumi M, Abe J, Tsuchiya K, Berk BC, Tamaki T. Stress and vascular responses: atheroprotective effect of laminar fluid shear stress in endothelial cells: possible role of mitogen-activated protein kinases. *J Pharmacol Sci* 2003; 91: 172-176.
 64. Montero I, Orbe J, Varo N, Beloqui O, Monreal JJ, Rodríguez JA, Díez J, Libby P, Paramo JA. C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1369-1378.