

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

*Estudio de las propiedades antiaterogénicas de
las HDL de ratones transgénicos de apoA-II
humana.*

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presentado por:

Vicent Ribas Serra

El Interesado

Visto Bueno de los directores de Tesis:

Dr. Francisco Blanco Vaca

Servei de Bioquímica

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Dr. José Luis Sánchez Quesada

Institut de Recerca

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Barcelona, marzo de 2005

Índice

ÍNDICE	3
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	7
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	11
1. <i>Estructura y características de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)</i>	13
2. <i>Metabolismo de las HDL</i>	16
3. <i>Apolipoproteínas de HDL</i>	18
ApoA-I	18
ApoA-II	20
ApoA-IV	23
ApoA-V	24
ApoE	25
ApoJ	25
ApoD	26
Proteínas amiloide sérico A (SAA)	26
4. <i>Enzimas, proteínas transportadoras y receptores implicados en el metabolismo de las HDL</i>	27
Lipoproteína lipasa (LPL)	27
Lipasa hepática (HL)	27
Lipasa endotelial (EL)	28
Lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT)	28
Proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP)	30
Proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP)	30
Proteína reguladora del eflujo de colesterol (ABCA1)	31
Receptor <i>Scavenger</i> tipo B-I (SR-BI)	32
Paraoxonasa (PON1)	34
Acetilhidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH)	36
Glutación selenoperoxidasa plasmática (GPX3)	37
5. <i>Funciones de las HDL de potencial relevancia antiaterogénica</i>	38
Transporte reverso de colesterol	38
Prevención de la modificación oxidativa de las LDL	41
OBJETIVOS	47

MATERIAL Y MÉTODOS 51

1. <i>Animales</i>	53
2. <i>Inmunohistoquímica y cuantificación de lesión arteriosclerótica en aorta</i>	53
3. <i>Lípidos y lipoproteínas</i>	55
Parámetros lipídicos y apolipoproteínas.....	55
Aislamiento de lipoproteínas.....	55
Cromatografía de gelfiltración (<i>Fast protein liquid chromatography</i> , FPLC)	56
4. <i>Actividades enzimáticas</i>	56
Paraoxonasa 1 (PON1).....	56
Acetilhidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH).....	57
Lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT).....	57
Glutación selenoperoxidasa plasmática (GPX3).....	58
5. <i>Marcadores de estrés oxidativo y vitaminas antioxidantes</i>	58
Determinación de 8-isoprostano.....	58
Medida de TBARS.....	59
Determinación de vitaminas antioxidantes.....	60
6. <i>Ensayos de oxidación en lipoproteínas</i>	60
Migración electroforética	60
Determinación de hidróxidos de ácidos grasos	61
Monitorización de formación de dienos conjugados	61
Monitorización de la fluorescencia de DCF.....	62
7. <i>Cuantificación de RNA mensajeros</i>	63
8. <i>Incubaciones de HDL con apoA-II humana pura e inmunodetección</i>	63
9. <i>Determinación de parámetros fecales y absorción intestinal de colesterol</i>	64
Extracción de lípidos.....	65
Extracción de ácidos biliares.....	65
Medida de ácidos biliares.....	66
10. <i>Medida del transporte reverso de colesterol específico de macrófagos</i>	66
Acetilación de las LDL	66
Cultivos celulares y marcaje con [³ H] colesterol.....	67
Medida del transporte reverso de colesterol específico de macrófagos.....	68
11. <i>Análisis estadístico</i>	69

RESULTADOS 71

RESULTADOS, CAPÍTULO I:	73
PROTECCIÓN DE LAS HDL FRENTE A LA OXIDACIÓN	73
1. <i>Lípidos plasmáticos</i>	75
2. <i>Análisis inmunohistoquímico y morfométrico de las lesiones aórticas</i>	77
3. <i>Marcadores de estrés oxidativo en plasma y antioxidantes lipofílicos</i>	78
4. <i>Capacidad de las HDL de proteger a la LDL de la modificación oxidativa</i>	79
5. <i>Análisis de la composición y propiedades de las HDL</i>	84

Estudio de las HDL aisladas por ultracentrifugación	86
Estudio del perfil de las HDL por cromatografía de gel filtración (FPLC)	88
Determinación de RNA mensajeros hepáticos de enzimas y apolipoproteínas asociados a HDL	92
Estudio del desplazamiento <i>in vitro</i> de la PON1 por apoA-II humana pura.....	93
RESULTADOS CAPÍTULO 2:	97
TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL DE HDL	97
1. <i>Determinación de parámetros fecales y absorción de colesterol.</i>	99
2. <i>Transporte reverso de colesterol específico de macrófagos en ratones transgénicos de apoA-II humana.</i> 101	
DISCUSIÓN.....	105
DISCUSIÓN CAPÍTULO 1:	107
PROTECCIÓN DE LAS HDL FRENTE A LA OXIDACIÓN.....	107
DISCUSIÓN CAPÍTULO 2:	121
TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL	121
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA.....	135
AGRADECIMIENTOS	161

Índice de Figuras y Tablas

Introducción

<i>Tabla I- 1 Características y clasificación de las HDL de plasma humano.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura I- 1. Esquematización de las características de las HDL.</i>	<i>15</i>
<i>Figura I-2. Vías implicadas en la generación e interconversión de las HDL.</i>	<i>16</i>
<i>Figura I- 3. Modelos moleculares propuestos para las HDL.</i>	<i>19</i>
<i>Figura I-4. Modelo para la oxidación de la LDL por las células de la pared aórtica.</i>	<i>45</i>

Resultados

<i>Tabla R- 1. Parámetros lipídicos de no-HDL y HDL del plasma de ratones</i>	<i>75</i>
<i>Tabla R- 2. Áreas de tinción positiva para lesiones arterioscleróticas e inmunohistoquímica.</i>	<i>77</i>
<i>Tabla R- 3. Marcadores de oxidación plasmática y vitaminas antioxidantes lipofílicas. ..</i>	<i>79</i>
<i>Tabla R-4. Actividades plasmáticas de los enzimas asociados a HDL relacionados con la capacidad antioxidante de las HDL.</i>	<i>85</i>
<i>Tabla R-5. Composición porcentual de lípidos y proteína de HDL, separadas por ultracentrifugación.</i>	<i>86</i>
<i>Tabla R-6. Actividades específicas de enzimas y antioxidantes asociados a HDL: arilesterasa, PAF-AH.</i>	<i>87</i>
<i>Tabla R-7. Medida de la expresión génica de apolipoproteínas y enzimas asociados a HDL.</i>	<i>92</i>
<i>Tabla R-8. Balance de colesterol, lípidos, sales biliares a través del tracto gastrointestinal.</i>	<i>100</i>
<i>Tabla R-9. Transporte reverso de colesterol in vivo de macrófagos marcados con [³H] colesterol libre.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabla R-10. Transporte reverso de colesterol in vivo de macrófagos marcados con oleato de [³H] colesterol.</i>	<i>103</i>

<i>Figura R- 1. Perfiles FPLC representativos de colesterol , triglicéridos y fosfolípidos de plasma.</i>	<i>76</i>
<i>Figura R- 2. Secciones representativas de tinción con Oil Red O (ORO) y MDA-2 en aortas de ratones 11.1.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura R- 3. Protección de la HDL de la oxidación de la VLDL y LDL murina.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura R- 4. Protección de la oxidación de LDL humana por parte de las HDL (movilidad electroforética relativa).....</i>	<i>82</i>
<i>Figura R-5. Contenido de HODEs de las LDL humanas oxidadas en presencia de HDL de las diferentes líneas.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura R- 6. Ensayos de protección de la oxidación de las LDL humanas por parte de las HDL: fluorescencia de DCF y fase de latencia de cinética oxidación de LDL.</i>	<i>83</i>
<i>Figura R-7. Perfiles representativos de FPLC de las fracciones de HDL: apolipoproteínas y lípidos.</i>	<i>89</i>
<i>Figura R-8 Perfiles representativos de FPLC de las fracciones de HDL: Enzimas antioxidantes</i>	<i>91</i>
<i>Figura R-9. Efecto del enriquecimiento de las HDL con apoA-II humana.</i>	<i>94</i>

Abreviaturas

[³ H] Colesterol	Colesterol tritiado
4-HNE	4-hidroxinonenal
9-HODE	Ácido 9-hidroxi-octadeca 9,13 dienoico
13-HODE	Ácido 13-hidroxi-octadeca 9,13 dienoico
ABCA1	Proteína reguladora del eflujo de colesterol (<i>ATP binding cassette A1</i>)
apo	Apolipoproteína
BHT	Butiril hidroxitolueno
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
DCF	Diacetato de 2,7- diclorofluoresceína
dpm	Desintegraciones por minuto
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido dietilen-diamino tetraacético
EGTA	Ácido etilen-glicol bis-aminoeti-eter tetraacético
EIA	Enzimoinmunoensayo
EL	Lipasa endotelial
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas
GC-MS	Cromatografía gases- espectrometría de masas
GGE	Electroforesis en gel de gradiente
GPX3	Glutación selenoperoxidasa plasmática
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HL	Lipasa hepática
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
LCAT	Lecitina-colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPD	Plasma libre de lipoproteínas
LPL	Lipoproteína lipasa
MDA	Malondialdehído

M-MLV (H-)	Virus de leucemia murina de Moloney, mutante RNAsa H-
NAD ⁺	Nicotín-adenin-dinucleótido oxidado
NADPH	Nicotín-adenin-dinucleótido fosfato reducido
NBT-BCIP	Azul cloruro de nitrotetrazolio- 5-Bromo-4-cloro-3-indoil fosfato
ORO	Oil Red O
PAF-AH	Acetil hidrolasa del factor activador plaquetario
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Salino tamponado con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDVF	Polivinilideno difluoruro
PLTP	Proteína transferidora de fosfolípidos
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PON1	Paraoxonasa 1
PON2	Paraoxonasa 2
PON3	Paraoxonasa 3
PUFA	Acido graso poliinsaturado
REM	Movilidad electroforética relativa
RNA	Ácido ribonucleico
SAA	Proteína sérica amiloide A
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> tipo B-I
TBARS	Sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico
TBS	Salino tamponado con Tris
TLC	Cromatografía en capa fina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TTBS	Tween-TBS
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

Introducción

1. Estructura y características de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL forman una de las principales familias de lipoproteínas presentes en el plasma. El colesterol transportado por las HDL ha sido considerado un factor protector frente a la arteriosclerosis, mientras el colesterol de LDL constituye un factor de riesgo. Estos conceptos tienen su base en varios estudios clínicos y epidemiológicos que han demostrado una relación inversa entre la concentración del colesterol de HDL y el riesgo de sufrir arteriosclerosis, mientras esta relación es directa en el caso del colesterol de LDL [1].

El nombre de HDL (*high density lipoprotein*) implica la utilización de un criterio de densidad en la clasificación de las familias lipoproteicas y asimismo, el método utilizado (ultracentrifugación) para su separación de otros componentes del plasma. En esta separación se obtienen las diferentes familias de lipoproteínas: los quilomicrones, VLDL (*very low density lipoprotein*), IDL (*intermediate density lipoprotein*), LDL (*low density lipoprotein*) y las HDL. Utilizando como clasificación este mismo criterio de densidad, se puede distinguir dos subpoblaciones mayoritarias, las HDL2 (densidad entre 1,063 y 1,125 g/mL) y las HDL3 (densidad entre 1,125 y 1,210 g/mL) y las pre β -HDL de más de 1,210 g/mL.

Otra forma de clasificación clasifica las partículas de HDL en función de su contenido apolipoproteico. Las apolipoproteínas son proteínas, normalmente de composición bastante hidrofóbica, que estabilizan la estructura y confieren buena parte de la funcionalidad a las lipoproteínas. La apolipoproteína A-I (apoA-I) es la proteína cuantitativamente más abundante en HDL, seguida de la apoA-II. Ello da lugar al concepto frecuentemente utilizado de HDL con apoA-I y sin apoA-II, HDL con apoA-I y con apoA-II, y HDL con apoA-II y sin apoA-I [2]. Hay que tener en cuenta que esta clasificación no tiene en cuenta el contenido de las HDL en otras apolipoproteínas minoritarias: C-I, C-II, C-III, A-IV, E, D, J y H. Por tanto,

incluso dentro de cada uno de estos tipos de partículas existe una heterogeneidad apolipoproteica importante. Otra clasificación, basada en la movilidad electroforética en geles de agarosa, agrupa a las subpoblaciones de HDL según su carga eléctrica, y por tanto, según su movilidad como α , pre- β y γ . La separación de las HDL según su tamaño se puede realizar utilizando la electroforesis en un gel no desnaturizante en gradiente de poliacrilamida. De esta forma se obtienen poblaciones que, a semejanza de las obtenidas por ultracentrifugación, se denominan (de menor a mayor diámetro medio) HDL3c (7,6 nm), HDL3b (8,0 nm), HDL3a (8,4nm), HDL2a (9,2 nm) y HDL2b (10,6 nm) [3]. En la [Figura I-1](#) y la [Tabla I-1](#) se resumen las características de las HDL humanas y su clasificación. Las HDL de ratón no tienen tanta heterogeneidad de tamaños y se muestran como una población homogénea de unos 10 nm de diámetro.

Además de las apolipoproteínas, en el componente proteico de las HDL se encuentran enzimas que están asociados a la partícula de HDL. Entre estos enzimas se encuentran los que están asociados al metabolismo de las HDL como son la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP). Además, en estas partículas también se pueden encontrar asociados otros enzimas con un papel menos claro o desconocido en las HDL como son la paraoxonasa 1 (PON1), paraoxonasa 3 (PON3), acetilhidrolasa de factor plaquetario (PAF-AH), y glutatión selenoperoxidasa plasmática (GPX3). En determinadas condiciones fisiológicas la composición de las HDL puede variar, como es el caso de la respuesta a fase aguda, en la cual aparecen en el plasma proteínas como son el amiloide sérico A, la ceruloplasmina y la apoJ, que se asocian a HDL y pueden variar su estructura y funcionalidad.

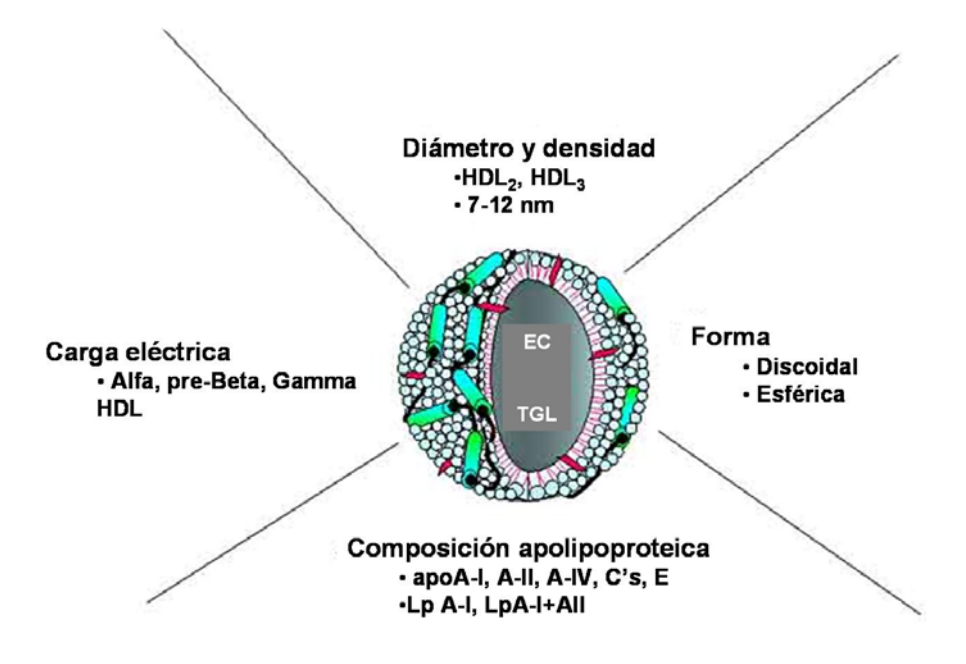


Figura I- 1. Esquematación de las características de las HDL.

Clasificación según criterios de tamaño, densidad, carga eléctrica (movilidad electroforética), composición apolipoproteica y forma. EC, ésteres de colesterol; TGL, triglicéridos. Adaptado de [4].

Tabla I- 1 Características y clasificación de las HDL de plasma humano.

<i>Propiedad</i>	<i>Pre-beta HDL</i>	<i>HDL₂</i>	<i>HDL₃</i>
Peso Molecular (Dalton)	Pre-beta ₁ : 71.000 Pre-beta ₂ : 325.000	360.000	175.000
Movilidad Electroforética	Pre-beta	alfa	alfa
Densidad (g/ml)	>1,210	1,063-1,125	1,125-1,210
Subpoblaciones	Pre-beta ₁ , Pre-beta ₂ , Pre-beta ₃	HDL _{2b} , HDL _{2a}	HDL _{3a} , HDL _{3b} , HDL _{3c}
Diámetro (nm)	Pre-beta ₁ : 5.4-7 Pre-beta ₂ : 12-14	HDL _{2b} : 9,7-12 HDL _{2a} : 8.8-9,7	HDL _{3a} : 8,2-8,8 HDL _{3b} : 7,8-8,2 HDL _{3c} : 7,2-7,8
(mg apo A-I/dL)	6-8	13,9	34,4
(mg colesterol/dL)		17,7	30,6

2. Metabolismo de las HDL

El metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad está esquematizado en la Figura I-2.

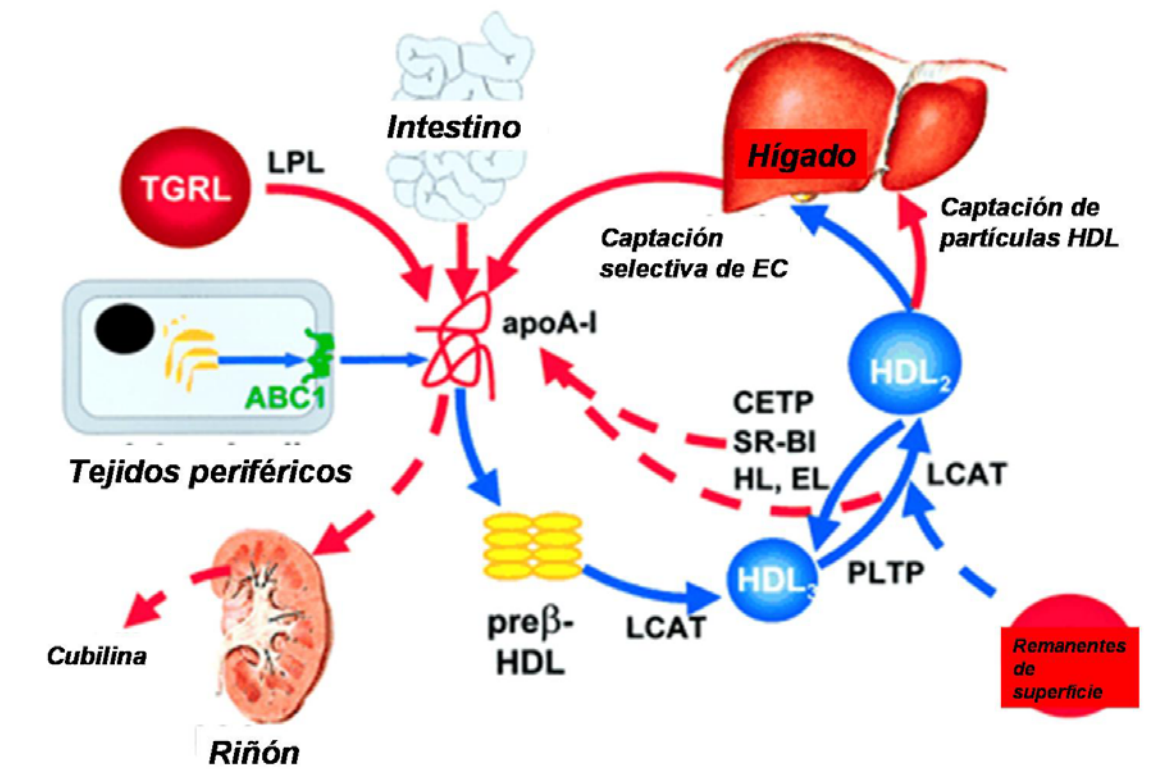


Figura I-2. Vías implicadas en la generación e interconversión de las HDL.

Abreviaturas: TGRL, lipoproteínas ricas en triglicéridos; EC, ésteres de colesterol, LPL lipoproteína lipasa; ABC1 proteína reguladora del eflujo del colesterol; CETP proteína transferidora de ésteres de colesterol, SR-BI receptor scavenger B-1; HL lipasa hepática; EL lipasa endotelial; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferasa; PLTP proteína transferidora de fosfolípidos. Esquema adaptado de [5].

Las HDL₂ y HDL₃ maduras proceden de precursores de apoA-I libre y pre-β-HDL que son producidos como HDL nacientes HDL por el hígado o intestino, o bien son liberadas por la lipólisis que la lipoproteína lipasa (LPL) efectúa sobre las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y quilomicrones). El eflujo de colesterol mediado por ABCA1 desde las células es importante para la lipidización inicial de las lipoproteínas de HDL y la esterificación del colesterol por la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) provoca que el colesterol pase al núcleo de la partícula,

generando partículas esféricas. Estas partículas continúan creciendo por la acción de la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) que media la fusión de remanentes de superficie y la LCAT continúa esterificando colesterol. En sentido inverso las partículas grandes HDL2 son de nuevo convertidas a HDL3 por varios mecanismos. La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) intercambia ésteres de colesterol de las HDL2 por triglicéridos de las lipoproteínas con apoB (VLDL y LDL), y posteriormente la lipasa hepática (HL) hidroliza los triglicéridos y fosfolípidos de la HDL disminuyendo su diámetro.

Por otro lado el receptor *scavenger* B-1 (SR-BI) en el hígado y en los tejidos esteroideogénicos (glándulas adrenales y gónadas) recoge selectivamente los ésteres de colesterol de las HDL2, vaciándolas. La interconversión de HDL2 en HDL3 mediada por CETP y HL, y la conversión de HDL3 en HDL2 mediada por la PLTP liberan apoA-I libre o partículas pobres en lípidos. Una parte de la apoA-I libre puede adquirir lípidos y empezar el ciclo de nuevo a través del eflujo de colesterol mediada por ABCA1, pero una parte es filtrada a nivel glomerular en el riñón, es reabsorbida a nivel tubular por el receptor cubilina-megalina, e hidrolizada en las células tubulares del riñón.

Los lípidos de HDL son catabolizados bien de manera separada de sus proteínas, como es la transferencia de ésteres de colesterol a través de la CETP a otras lipoproteínas o a través de SR-BI a tejidos, o bien conjuntamente como partícula. En este último punto se ha identificado una proteína en la membrana de los hepatocitos, que une apoA-I y media la endocitosis de la partícula. Esta proteína ha resultado ser la cadena beta del complejo ATP sintasa [6], y aún queda por dilucidar el mecanismo y la importancia de este componente de la cadena interna mitocondrial en el metabolismo de las HDL.

En los siguientes apartados se describen con cierto detalle las características de las apolipoproteínas y se exponen con más detalle los diferentes pasos de el metabolismo de HDL.

3. Apolipoproteínas de HDL

ApoA-I

La apoA-I es el principal componente proteico (68% de la masa proteica) de las HDL. También se encuentra presente en pequeñas cantidades en los quilomicrones, pero no en lipoproteínas que contienen apoB-100 (VLDL y LDL). La apoA-I está compuesta por 243 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 28 kDA [7]. Se sintetiza en el hígado y en el intestino, como producto de un gen que se encuentra en la región q23 del cromosoma 11, cerca de los genes de las apos C-III y A-IV, y del de la insulina [8]. Las partículas esféricas de HDL contienen de 2 a 4 moléculas de apoA-I, cuya estructura es probable que sea parecida a las de las HDL discoidales, que contienen dos moléculas de apoA-I. En la [Figura I-3](#) se representa un modelo de la organización de la apoA-I en partículas discoidales y esféricas.

La apoA-I juega un papel estructural central en las HDL, como se demuestra en los casos de deficiencia de apoA-I, que se asocian con deficiencia de HDL. La apoA-I juega un papel fundamental en el inicio del eflujo de colesterol desde las células ya que es el aceptor de fosfolípidos y colesterol que son transferidos por la proteína reguladora del eflujo de colesterol (ABCA1). En la maduración de las HDL la apoA-I también es un factor decisivo, ya que es el cofactor de la LCAT [9]. Se ha atribuido a la apoA-I el papel de actuar de ligando del receptor SR-BI [10], y por tanto, de participar en la captación por parte del hígado y de tejidos esteroideogénicos de los ésteres de colesterol transportados por las HDL.

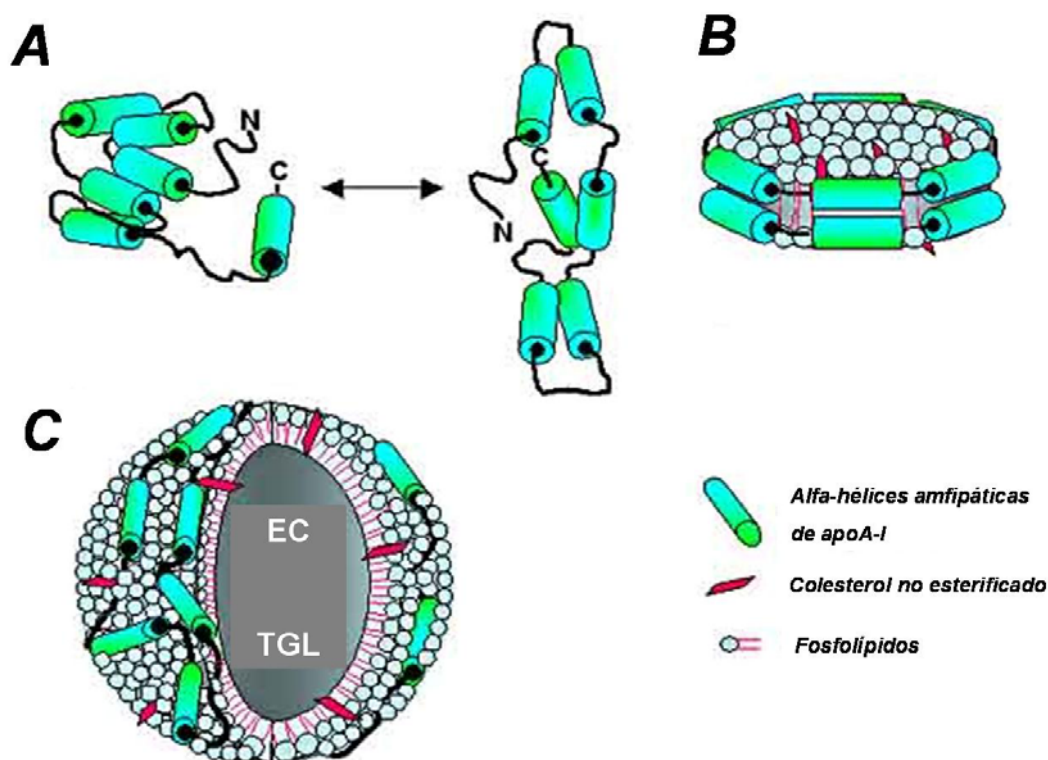


Figura I-3. Modelos moleculares propuestos para las HDL.

Panel A. Modelo de apoA-I libre incorporando estructuras globulares y de hélice en una conformación de bastón abierto. Panel B. Modelo molecular de cinturón para un complejo fosfolípido/apoA-I. La organización de las alfa-hélices anfipáticas son perpendiculares a la dirección de los ácidos grasos de los fosfolípidos. El par de moléculas de apoA-I están en una orientación antiparalela, permitiendo un alineamiento entre hélices de puentes salinos entre ellas. Panel C. HDL esférica en la cual los lípidos y las apolipoproteínas están unidas por fuerzas no covalentes. La estructura es de una esfera de unos 10 nm de diámetro con un núcleo no polar de ésteres de colesterol (EC) y triglicéridos (TGL) encapsulado por una monocapa superficial de alfa-hélices anfipáticas de apoA-I y fosfolípidos. Adaptado de [4]

La generación de ratones transgénicos para la apoA-I, tanto de apoA-I de ratón como apoA-I humana, ha permitido el estudio de su efecto en la susceptibilidad a la arteriosclerosis. La conclusión de diferentes estudios es clara: la sobreexpresión de apoA-I previenen la arteriosclerosis en modelos animales alimentados con una dieta aterogénica [11] y en animales que desarrollan arteriosclerosis masiva como ratones deficientes en apoE y transgénicos para la apo(a) [12,13]. En conclusión, la sobreexpresión de apoA-I da lugar a un incremento del colesterol de HDL que es

capaz de prevenir la arteriosclerosis. Este concepto coincide con los datos epidemiológicos en los cuales se encuentra una relación inversa entre colesterol de HDL y arteriosclerosis.

También se han generado ratones modificados genéticamente por inactivación (*knockout*) del gen de la apoA-I. Estos animales son deficientes en HDL demostrando hasta que punto la apoA-I es importante para la estructura de las HDL [14]. La ausencia de apoA-I causa deficiencia funcional de la LCAT, lo que también ilustra sobre la necesidad de la apoA-I como cofactor de este enzima *in vivo* [15]. Pese a que la apoA-I no es necesaria para mantener la concentración de LCAT en el plasma, la deficiencia de LCAT es en si misma un factor suficiente para causar deficiencia de HDL. Sin embargo, los ratones sin apoA-I no desarrollan más arteriosclerosis que los ratones control ni en dieta de mantenimiento ni en dieta rica en grasas [16]. En cambio, existe un aumento de susceptibilidad a la arteriosclerosis en ratones deficientes de apoA-I que expresan apoB-100 humana [17]. Por tanto, estos datos también apoyan el concepto contrastado en estudios de humanos y que consiste en que el aumento de apoA-I y HDL previene la arteriosclerosis, pero la deficiencia de apoA-I y HDL no necesariamente favorece el desarrollo de la misma si no existen otros factores de riesgo. Por último, el estudio de los ratones modificados genéticamente para carecer de apoA-I ha permitido establecer el importante y específico rol de la apoA-I en el transporte de colesterol de HDL a los tejidos esteroideogénicos. En estos animales, aunque no en ratones deficientes de apoA-II con una deficiencia de HDL similar, hay deficiencia de ésteres de colesterol en tejidos esteroideogénicos, indicando una deficiente transferencia de ésteres de colesterol a estos tejidos [18].

ApoA-II

El gen de la apoA-II se encuentra en la región q21-23 del cromosoma 1 [19]. El lugar de síntesis esencial es el hígado y en pequeñas cantidades en el intestino delgado. En el plasma humano la forma más abundante de apoA-II es un homodímero de 77 aminoácidos por péptido, unidos por un puente disulfuro

formado por la única cisteína existente en cada molécula y que se encuentra en la posición 6 [20]. Otras formas moleculares menos abundantes son el heterodímero de apoA-II-apoE y de apoA-II-apoD y la forma monomérica [21,22]. La apoA-II de ratón carece de esta cisteína y al no poder formar el puente disulfuro, sólo se encuentra en forma monomérica. La apoA-II presenta un elevado porcentaje de α -hélice (62%) [23], presentando una afinidad más alta que la de apoA-I por las monocapas lipídicas. Por ello, y al menos *in vitro*, un exceso de apoA-II puede desplazar a la apoA-I de las HDL [24].

La concentración plasmática de apoA-II en personas normolipémicas es de alrededor de 33-35 mg/dL [25], lo que representa aproximadamente el 20% de la proteína de HDL, siendo la segunda apolipoproteína más abundante en las HDL después de la apoA-I. Estudios cinéticos han demostrado que, en contraste con la apoA-I, la concentración de apoA-II en el plasma es regulada principalmente por la velocidad de síntesis y no por su catabolismo [25].

La función de la apoA-II está mal definida y su estudio ha dado lugar a muchos resultados contradictorios. Por ejemplo, diversos estudios *in vitro* han concluido que la apoA-II activa o inhibe la acción de la lipasa hepática [26] y de la proteína transferidora de ésteres de colesterol [27,28]. También, se han descrito efectos opuestos respecto si las HDL que contienen apoA-I y apoA-II favorecen o antagonizan el eflujo de colesterol celular [29,30]. Parece, por el contrario, que hay un mayor consenso en que la apoA-II no es, a diferencia de la apoA-I, un cofactor de la LCAT y que, en exceso, incluso puede bloquear tal activación [31-33].

La hiperexpresión de la apoA-II en ratones transgénicos se ha realizado utilizando tanto el gen humano como el gen de ratón. Los ratones transgénicos de apoA-II de ratón se caracterizan por presentar concentraciones de colesterol de HDL aumentadas y partículas de HDL de tamaño mayor que la de los ratones control [34]. Estas HDL no solo no protegen contra la modificación de las LDL sino que además presentaron características proinflamatorias [35]. Como en el caso de

los ratones transgénicos de apoA-II de ratón, presentan una mayor susceptibilidad a la arteriosclerosis si bien ésta es más evidente en dieta de mantenimiento o pobre en grasas que en dieta rica en grasas [36]. Estas características coinciden con las de una cepa de ratones que fueron seleccionadas por expresar de manera natural más apoA-II que sus congéneres [37,38].

La hiperexpresión de apoA-II humana provoca la aparición de partículas de HDL más pequeñas que las presentes en el plasma de ratones control. [39]. Además, en las líneas de ratones transgénicos con mayor concentración de apoA-II humana existe deficiencia de apoA-II y apoA-I de ratón, especialmente cuando los animales son alimentados con dieta estándar, y como consecuencia del déficit de apoA-I, deficiencia funcional de LCAT [33,40]. Así en estos ratones, la concentración de LCAT es normal, pero este enzima es muy poco reactivo ante las partículas de HDL, que tienen poca apoA-I y mucha apoA-II. Como resultado de esta falta de reactividad hacia la LCAT, se produce un descenso muy importante de partículas α -HDL y acumulaciones de colesterol libre en la córnea de estos animales [40].

La hiperexpresión de apoA-II humana tiene un efecto pro-aterogénico, ya que aumenta la susceptibilidad a la arteriosclerosis de ratones transgénicos de apoA-II humana, de ratones transgénicos de apoA-II humana con un fondo genético de deficiencia de apoE [41] y, aunque con menor consistencia, en un modelo con fondo genético de hiperexpresión de CETP [42]. La hiperexpresión conjunta de los genes de apoA-II y apoA-I humanas provoca la pérdida de buena parte de la protección frente a la arteriosclerosis conferida por la hiperexpresión únicamente de apoA-I, además sin cambios en la composición lipídica de las HDL [43]. Sin embargo en ratones transgénicos obtenidos de manera independiente que expresan moderadamente apoA-II humana se encontró una protección mayor frente a la oxidación de las LDL respecto a los ratones control no transgénicos, a pesar de encontrar una disminución de actividades PON y PAF-AH en plasma,

sugiriendo un papel de protección contra la oxidación de manera directa de la apoA-II humana [44].

Se ha relacionado la apoA-II con la hiperlipemia familiar combinada en estudios en ratones modificados genéticamente. Se ha descrito que la sobreexpresión de apoA-II en ratones, además de aumentar la arteriosclerosis, aumenta los niveles de triglicéridos, los ácidos grasos libres y la resistencia a la insulina [36]. Por otro lado, en los ratones deficientes en la apoA-II se dan fenotipos opuestos: sensibilidad a la insulina y disminución del perfil lipídico aterogénico [45]. La sobreexpresión de ApoA-II humana en ratones deficientes de apoE ha servido como modelo de la hiperlipemia familiar combinada, apoyando la idea de que esta proteína puede tener un papel en esta enfermedad [41].

ApoA-IV

La apoA-IV es una glicoproteína de 46 kDa que se encuentra principalmente asociada a HDL y a la fracción no lipoproteica del plasma en situación de ayunas, o a quilomicrones si el sujeto se encuentra en período postprandial [46]. El gen de la apoA-IV se expresa mayoritariamente en el intestino. Se encuentra en un complejo junto a los genes A-I y C-III.

Se han sugerido diversas funciones para la apoA-IV, algunas de ellas ya propuestas como acción de otras apolipoproteínas. Una vez en la circulación sanguínea, la apoA-IV es desplazada de los quilomicrones por las aposC. De esta forma indirecta, la apoA-IV es uno de los reguladores de la acción de la lipoproteína lipasa sobre los quilomicrones [47]. Además se ha atribuido a la apoA-IV un papel en la absorción de las vitaminas liposolubles [48]. La apoA-IV tiene un efecto estabilizador de la LCAT y activa del eflujo de colesterol en cultivos celulares, por lo que puede ser una pieza importante en el transporte reverso de colesterol. En este aspecto, la apoA-IV está mayoritariamente en partículas sin apoA-I y que contienen LCAT y CETP [49]. Por otra parte, la apoA-IV no asociada a lipoproteínas está ampliamente presente en el tejido intersticial

por lo que es probable que su acción en el transporte reverso de colesterol hacia el hígado sea biológicamente relevante.

Ratones transgénicos de apoA-IV humana alimentados con dieta rica en colesterol y grasas presentan menos lesiones de arteriosclerosis que los ratones control. [50]. Además, la hiperexpresión de apoA-IV reduce la arteriosclerosis de ratones *knockout* de apoE [50]. Al menos en este modelo, la acción antiaterogénica de la apoA-IV es independiente de la concentración de HDL.

ApoA-V

Es una apolipoproteína de 343 aminoácidos de 39 kDa, con un 27% de homología con la apoA-IV, que se expresa exclusivamente en hígado. La apoA-V se encuentra en el plasma, fundamentalmente asociada a HDL. El gen que codifica por esta proteína descubrió recientemente a través del análisis comparativo de secuencias y por expresión diferencial como un gen altamente expresado en regeneración hepática [51].

Existen evidencias experimentales de que esta apolipoproteína modula los niveles de triglicéridos plasmáticos. Los ratones *knockout* de apoA-V presentaron unos niveles de triglicéridos plasmáticos cuatro veces superiores a los ratones controles, mientras que los ratones transgénicos de apoA-V mostraron una disminución del 66% [52]. Estos cambios en los triglicéridos plasmáticos se produjeron sin cambios significativos en el colesterol de ninguna de las fracciones lipoproteicas. Sin embargo, la hiperexpresión de apoA-V mediada por la transferencia de adenovirus recombinantes, logró una reducción del 70% de los triglicéridos, pero también una reducción del 40% del colesterol plasmático, especialmente el colesterol de HDL [51]. Asimismo, se ha encontrado una asociación entre polimorfismos de la apoA-V y los niveles plasmáticos de triglicéridos en algunos de estos polimorfismos [53]. El mecanismo por el cual la apoA-V modula los niveles de triglicéridos está aún por dilucidar.

ApoE

Aunque se trata de una apolipoproteína de 34 kDa, muy estudiada y de gran interés, no todas sus características se relacionan con un papel específico en HDL. Hay un tipo de partículas de HDL que contienen únicamente apoE, de migración electroforética pre- β , que parecen ser capaces de inducir en primera instancia el transporte reverso de colesterol desde las membranas de fibroblastos al plasma [54]. Sin embargo estas partículas sólo están presentes en los individuos que tienen al menos un alelo apoE3, no existiendo en homocigotos para el alelo apoE4 o apoE2 [55]. Por lo tanto, el polimorfismo de apoE podría determinar de forma importante el transporte reverso de colesterol. También, se ha relacionado a la apoE con la esterificación del colesterol en HDL y con la efectividad de la transferencia de ésteres de colesterol de HDL al receptor SR-BI [56].

ApoJ

Es una glicoproteína de 427 aminoácidos y aproximadamente 70 kD, que post-traduccionalmente es fragmentada entre los residuos 205 y 206, resultando dos unidades: apoJ (aminoácidos 1-205) y apoJ (aminoácidos 206-427). Ambas unidades se mantienen unidas por puentes disulfuro [57,58]. La apoJ se sintetiza en una gran variedad de tejidos y se encuentra en el plasma principalmente en partículas de HDL que no contienen ninguna otra apolipoproteína, aunque sí al menos alguna de estas partículas contiene también PON1. En algunos estudios se ha demostrado un incremento claro del cociente apoJ/PON1 en ratones que por modificación genética o dieta son susceptibles a la arteriosclerosis, así como en humanos [59]. La apoJ se ha demostrado que se une al receptor glicoproteico 330, como lo hacen otros ligandos del tipo de la lipoproteína lipasa o la apoE [60]. Se trata de un receptor estructuralmente parecido al LRP, pero de distribución tisular diferente ya que se expresa fundamentalmente en el hígado. Dado que la apoJ aumenta en tejidos lesionados y tiene actividad inhibitoria del complejo C5b-C9, se ha propuesto que quizás la apoJ funcione en su unión al receptor glicoproteico 330 aclarando restos lipídicos o apoptóticos.

ApoD

Es una apolipoproteína de 33 kDa, perteneciente a la superfamilia de las lipocalinas, que se encuentra en el plasma fundamentalmente asociada a HDL [22]. Se trata de una proteína de 169 aminoácidos, cuya función es desconocida. Se ha postulado que podría unir ligandos del tipo de progestágenos o ácido araquidónico, aunque el significado fisiológico de esta posible función transportadora y su relación con el metabolismo de HDL son desconocidos [61,62].

Proteínas amiloide sérico A (SAA)

Las proteínas amiloide sérico A son una familia de moléculas altamente homólogas, que cumplen los criterios físico-químicos para ser considerados apolipoproteínas, y que forman parte de la estructura de las HDL. Esta familia puede ser dividida en dos grupos [63]. El primer grupo incluye las proteínas amiloides que aumentan espectacularmente durante la fase de reacción aguda que sigue a diferentes enfermedades o traumatismos. Estas proteínas se ha sugerido que desplazan a la apoA-I de la superficie de las HDL y pueden pasar, en las circunstancias patológicas mencionadas, a ser los componentes proteicos mayoritarios de las HDL [64]. Existen dos genes que codifican para SAA1 y SAA2, aunque hay variaciones alélicas que son responsables de que existan diferentes isoformas para cada gen. El segundo grupo consiste en un grupo de proteínas (SAA4 en humanos y SAA5 en el ratón) que constituyen entre el 1 y el 2% de la masa proteica de las HDL en situaciones fisiológicas. Aunque hasta recientemente se admitía que la deficiencia funcional de LCAT que aparece en la reacción de fase aguda era secundaria al déficit de apoA-I en HDL, la hiperexpresión de SAA (a niveles comparables a los que presentan humanos en reacción de fase aguda) en ratones transgénicos de apoA-I no causa reducción de colesterol de HDL o apoA-I en ausencia de la citada reacción [65]. La función de las proteínas amiloide sérico en el metabolismo y función de las HDL es poco conocido.

4. Enzimas, proteínas transportadoras y receptores implicados en el metabolismo de las HDL.

Lipoproteína lipasa (LPL)

Las características generales de esta proteína suelen analizarse en relación al metabolismo de las partículas ricas en triglicéridos más que en referencia al de HDL. Sin embargo, es conveniente añadir algunos comentarios respecto a la influencia de la acción de la LPL en el metabolismo de las HDL. Existen diferentes estudios que la relacionan la actividad de LPL y la concentración de colesterol de HDL en el plasma [66]. Por ejemplo, es bien conocido que las personas con deficiencia hereditaria de LPL (hiperquilomicronemia familiar) tienen concentraciones de HDL muy disminuidas [67]. Esto es probablemente debido a que este enzima al actuar sobre quilomicrones y VLDL cambia la relación corteza/núcleo de estas partículas, que tienden a recuperar su relación primitiva mediante el desprendimiento espontáneo de pedazos de corteza que flotan en el rango de densidad de HDL₂ [68]. Una explicación complementaria para explicar la correlación entre niveles de LPL y HDL, es que la primera determina la duración de la lipemia postprandial, y a que a mayor duración de la lipemia postprandial, mayor concentración de triglicéridos de HDL, y por tanto más actividad de lipasa hepática y mayor catabolismo de HDL.

Lipasa hepática (HL)

Es un enzima que se encuentra en la superficie de las células endoteliales del hígado, de donde puede ser liberado por una perfusión de heparina. Su acción es la hidrólisis de fosfolípidos y triglicéridos [69,70]. Las partículas lipoproteicas sobre las que actúa esta enzima son preferentemente IDL y HDL. En el segundo caso, su acción provoca el paso de partículas grandes (HDL₂) a otras más pequeñas (HDL₃), ya que la hidrólisis de triglicéridos de HDL provoca la disociación de moléculas de apoA-I de estas partículas [71]. De estas últimas se originan, probablemente, partículas de HDL de muy pequeño tamaño, cuya única

apolipoproteína es la apoA-I, y por cuya migración electroforética se clasifican como pre- β_3 -HDL [72].

El desarrollo de ratones *knockout* de apoA-II mostró deficiencia de HDL, pero en los ratones deficientes en apoA-II y también de HL no presentaron deficiencia de HDL, lo cual sugiere que la apoA-II inhibe los efectos de la HL en el metabolismo de HDL [73]. Sin embargo, la extrapolación a humanos de estos resultados debe ser realizada con cautela, ya que los humanos con deficiencia de apoA-II no presentan deficiencia de HDL. Además entre un 40 y un 50% de la HL de ratón circula en el plasma, mientras que la humana se encuentra unida a la superficie de los hepatocitos. Todo ello sugiere por tanto, diferencias especie-específicas en la regulación de la actividad de la HL.

Lipasa endotelial (EL)

Esta lipasa se ha clonado y analizado hace unos pocos años y se ha descrito que es sintetizada por células endoteliales *in vitro* y que *in vivo* se expresa en diversos órganos incluyendo hígado, placenta, pulmón y riñón, pero no músculo esquelético. Este enzima tiene fundamentalmente una acción fosfolipasa sobre HDL. La hiperexpresión de este gen produce una disminución del colesterol de HDL y de apolipoproteína A-I, lo que sugiere un rol funcional en el metabolismo de HDL [74].

Lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT)

Es un enzima de 416 aminoácidos que cataliza la hidrólisis y transferencia de un ácido graso de la fosfatidilcolina a la posición 3- β -OH del colesterol, produciendo éster de colesterol y lisofosfatidilcolina [75]. El sitio activo de este enzima incluye la serina 181 [76]. Este proceso de formación de ésteres de colesterol sucede especialmente a nivel de HDL, dado que la apoA-I y también la apoA-IV son cofactores de la reacción. La región de la apoA-I responsable de la activación de la LCAT está situada en la región entre los aminoácidos 140 y 150 de la apoA-I, y requiere una conformación determinada que se obtiene mediante la asociación a

lípidos de partículas HDL [77]. El colesterol que es esterificado por la LCAT proviene, en parte, directamente de las membranas celulares. Sin embargo, la fuente principal de colesterol libre para la reacción proviene de las LDL. La esterificación del colesterol es muy importante en la maduración de las HDL y en el transporte de reverso de colesterol [78].

La hiperexpresión de LCAT humana en ratones transgénicos resultó en aumento de HDL, produciéndose además un aumento inesperado en la susceptibilidad a la arteriosclerosis de estos animales [79]. Este efecto podría explicarse por la acumulación de HDL grandes, no funcionales, cargadas de lípidos y la reducción del catabolismo de éstas por el hígado podría dar lugar a partículas proaterogénicas. Otra observación importante derivada del estudio de estos animales modificados genéticamente es que la LCAT puede unirse a partículas de HDL ricas en apoA-II, pero en ausencia o disminución de la concentración de apoA-I la LCAT es muy poco activa sobre estas partículas [33].

Por el contrario, el desarrollo de ratones deficientes en LCAT se asocia a una fuerte disminución en la concentración de colesterol en HDL, apoA-I, apoA-II, aumento de triglicéridos plasmáticos y la acumulación de HDL nacientes de pequeño tamaño en el plasma [80]. En este modelo se constató, además, una reducción de las actividades paraoxonasa (PON1) y acetilhidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH), a pesar de tener los niveles de RNA mensajeros de estas proteínas en el hígado comparables a los de sus control [81], así como un aumento de la expresión del mensajero de SR-BI adrenal .

Además de su función en la esterificación del colesterol plasmático, se ha encontrado actividad antioxidante asociada a esta proteína [82] que podría tener relevancia para explicar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de las HDL. Sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo y existe controversia respecto a esta actividad [83].

Proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP)

La CETP humana es una proteína de 74 kD, cuyo gen se encuentra localizado en el cromosoma 16q13. Es secretada al plasma desde diferentes tejidos y circula asociada principalmente a HDL, desde donde promueve el intercambio y la redistribución entre lipoproteínas de colesterol, triglicéridos y, en menor cuantía, de fosfolípidos [84]. La acción de la CETP tiene como resultado la transferencia neta de ésteres de colesterol a las partículas ricas en triglicéridos y de triglicéridos hacia LDL y HDL. Es importante resaltar, sin embargo, que los ratones carecen de esta proteína en plasma.

Desde que fue identificada, la función de esta proteína en el metabolismo lipoproteico y su relación con la arteriosclerosis han sido discutidas. Por una parte, CETP puede ser antiaterogénica debido a su capacidad de participar en el transporte reverso de colesterol. Por otra parte, su acción de aumentar la concentración de colesterol de VLDL/LDL y aumentar el contenido de triglicérido de HDL (que se asocia a un mayor catabolismo de HDL como resultado de la acción de la HL) podría ser proaterogénica [84]. Recientemente, utilizando inhibidores de CETP se ha conseguido aumentar los niveles de colesterol de HDL pero el efecto de este aumento sobre el riesgo de enfermedad coronaria es aún desconocido [85].

Proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP)

Se trata de una proteína de 476 aminoácidos y un peso molecular de 54,7 kD con N-glicosilaciones que le dan un peso aparente de 75 kD. La secreción de la PLTP depende del segmento comprendido entre los residuos 35 y 50, y del plegamiento intracelular de la proteína, que es dirigido por un puente disulfuro entre las cisteínas de los residuos 129 y 168 [86,87]. Su asociación a HDL se debe a la unión de la PLTP a apoA-I cerca de los residuos 27 a 48 de ésta [88]. La PLTP se sintetiza en ovario, timo y placenta, y en menor cantidad en la mayoría del resto de órganos. Su función consiste en transferir fosfolípidos de unas partículas de HDL a otras, provocando el desplazamiento de apoA-I de la superficie de las

HDL, y por tanto la aparición de partículas de HDL más pequeñas (pre- β 1 HDL) [89]. Además las partículas sobre las que ha actuado la PLTP tienden a fusionarse, de ahí que tras la acción de esta proteína también se observen partículas de mayor tamaño.

La PLTP aumenta la unión de HDL y el eflujo de colesterol de las células. Este eflujo es específico de HDL y no se observa si sólo hay en el medio albúmina o apoA-I purificada, ni tampoco en el caso de que los fibroblastos provengan de un paciente afecto de la enfermedad de Tangier, y por tanto no tienen ABCA1 en su membrana plasmática. Se ha descrito que la PLTP además puede transferir colesterol libre, alfa-tocoferol, y lipopolisacárido, lo que sugiere que puede estar implicada en la defensa antimicrobiana además de en el metabolismo lipoproteico [90].

La generación de ratones deficientes en PLTP ha puesto de manifiesto la importancia de esta proteína en el metabolismo de HDL. Estos ratones presentan una disminución de fosfolípidos, colesterol y apoA-I en HDL cuando son alimentados con una dieta estándar. Cuando estos animales son alimentados con dieta rica en grasas, además se producen aumentos en fosfolípidos, colesterol libre y esterificado de VLDL y LDL (sin cambios en los niveles de apoB) [91]. En otro estudio con estos mismos ratones se describió un catabolismo acelerado de HDL y una acumulación de lipoproteínas lamelares ricas en ApoA-IV [92]. La hiperexpresión de PLTP mediante adenovirus en ratones control o transgénicos de apoA-I provocó, sin embargo, una disminución que llegó a ser casi total de HDL, junto con la aparición de algunas partículas de HDL de tamaño mayor que las de los ratones control [93].

Proteína reguladora del eflujo de colesterol (ABCA1)

La identificación y caracterización de esta proteína se realizó durante el estudio del gen causante de la enfermedad de Tangier. Individuos afectados de esta enfermedad genética tienen unos niveles de HDL extremadamente bajos

presentando además acumulación de ésteres de colesterol en células derivadas del sistema retículo-endotelial [94] y mayor riesgo de arteriosclerosis. Esta enfermedad está causada por defectos en el gen *ATP binding cassette A-1* (ABCA1) [95-97]. Ratones deficientes en esta proteína presentan una severa deficiencia en HDL y otras alteraciones coincidentes con el fenotipo descrito en humanos afectados de la enfermedad de Tangier y se ha descrito que el transporte de lípidos desde el Golgi a la membrana plasmática es defectuoso [98,99]. La topología de esta proteína, basada en predicciones teóricas, corresponde a una proteína con doce dominios transmembrana y dos lugares intracelulares de unión a ATP que podrían proporcionar energía para la transferencia de ligandos. En este modelo, se podrían distinguir dos mitades de la proteína con seis hélices transmembrana cada una, unidas por un largo segmento hidrofóbico que contiene una región reguladora [100]. El ABCA1 se localiza en la membrana plasmática, lo cual es consecuente con su papel propuesto de transporte de lípidos a lipoproteínas [101]. El ABCA1 probablemente transfiere colesterol libre y fosfolípidos entre la cara interna y la externa de la membrana plasmática, donde son capturados por la ApoA-I para la formación de HDL, y aunque por el momento no se conoce con certeza si éstos son sus verdaderos ligandos y si hay otras proteínas celulares implicadas [102], su importancia en el eflujo celular de colesterol hacia HDL es evidente y será discutido con más detalle en el apartado de transporte reverso de colesterol.

Receptor Scavenger tipo B-I (SR-BI)

El receptor *scavenger* tipo B-I, denominado CLA-1 en humanos, codifica para una proteína de membrana de 509 aminoácidos cuya estructura teórica contiene dos dominios citoplasmáticos, una gran región extracelular y dos dominios transmembrana. Este receptor tiene múltiples lugares de glicosilación potenciales, y de hecho el SR-BI es una proteína de 82 kDa altamente N-glicosilada, modificada también por acilaciones. El SR-BI une una gran variedad de ligandos, incluyendo lipoproteínas modificadas, productos finales de glicación de proteínas, fosfolípidos aniónicos y células apoptóticas. Asimismo este receptor también

puede unirse lipoproteínas nativas como HDL, LDL y VLDL [103]. Su localización en la membrana plasmática parece estar asociada sobre todo a dominios caveolares. Se expresa en varios tejidos, incluyendo el hígado, donde su expresión es regulada por varios mecanismos, incluyendo la actividad transcripcional de receptores nucleares.

La mayoría de estudios se han centrado en su actividad como receptor de superficie celular de HDL y fue el primero con esta actividad que fue descrito. El SR-BI media la captación selectiva de colesterol de HDL a través de la formación de complejos lipoproteína-receptor, los cuales requieren de dominios estructurales específicos y estados de conformación específicos de la apoA-I presente en las partículas de HDL. La transferencia selectiva de ésteres de colesterol parece ser mediada por un mecanismo de dos pasos, implicando un paso de unión inicial receptor-lipoproteína seguido de un paso de transferencia de lípido. En esta transferencia de ésteres de colesterol de las HDL a las células no se encuentra captación de proteína de HDL, y no se degrada la partícula. Se requieren estudios adicionales para determinar si en determinados tejidos la retroendocitosis de HDL juega un papel en esta captación selectiva de ésteres de colesterol [104].

La importancia del SR-BI en la relación entre el metabolismo del colesterol de HDL y la arteriosclerosis se ha puesto de manifiesto en una serie de estudios tanto *in vivo* como *in vitro* [105]. Estudios en animales utilizando transferencia génica con adenovirus, transgénesis y disrupción génica establecieron definitivamente la importancia del SR-BI como receptor de HDL *in vivo*. La sobreexpresión hepática de SR-BI se asoció a disminución del colesterol de HDL, aceleración del aclaramiento de ésteres de colesterol plasmáticos e incremento del colesterol en bilis, sugiriendo un transporte reverso de colesterol acelerado [103]. Por otro lado los ratones *knockout* de SR-BI presentaron elevadas concentraciones de colesterol de HDL, aclaramiento de ésteres de colesterol reducido y reducción de contenido y secreción de colesterol biliar. El SR-BI también juega un papel crítico en el control de los niveles de tocoferol de HDL y tisulares, que pueden tener

implicaciones en los fenotipos asociados a la deficiencia de SR-BI de los ratones *knockout* para este receptor [106].

SR-BI puede además mediar la transferencia bidireccional de colesterol libre entre células y lipoproteínas de manera pasiva, a favor de gradiente. De hecho los niveles de expresión de SR-BI correlacionan con la tasa de eflujo de colesterol hacia HDL en algunos tipos celulares, aunque la relevancia de este proceso *in vivo* está aún por determinar [107].

Existe una variante de *splicing* del SR-BI con un dominio carboxilo-terminal citoplasmático diferente, que ha sido denominada como SR-BII, que provoca una endocitosis rápida de la HDL, pero que sin embargo la captación de ésteres de colesterol por parte de las células es mucho menor que en el caso de el SR-BI. Su localización es sobre todo intracelular, aunque en menor proporción también está en la membrana plasmática y se ha propuesto que puede influir en el tráfico celular de colesterol, aunque a través de un mecanismo diferente al del SR-BI [108].

Paraoxonasa (PON1)

Este enzima pertenece al grupo de esterasas tipo A, que son capaces de hidrolizar diversos compuestos organofosforados. Se trata de una proteína de unos 45 kDa, cuyo gen en humanos está situado en el brazo largo del cromosoma 7. El gen de la paraoxonasa (PON1) es parte de una familia que tiene al menos tres genes relacionados, con gran homología estructural y que están agrupados en el mismo cromosoma, lo que sugiere un origen a partir de duplicación génica [109]. La PON1 se sintetiza y secreta fundamentalmente en el hígado y en el plasma se encuentra asociada a HDL, especialmente en partículas que contienen apoA-I y apoJ [110]. La PON1 es un enzima calcio-dependiente, siendo inhibida irreversiblemente al adicionar un quelante del calcio como es el ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) [111]. Una característica especial de esta proteína es que mantiene el péptido señal hidrofóbico del extremo N-terminal, que en la

mayoría de proteínas es hidrolizado en el procesamiento de la proteína. Este péptido señal es el responsable de su unión a la HDL a través de la unión directa a fosfolípidos [112].

Al parecer la PON1 protege de la inducción de la inflamación en células de la pared arterial, destruyendo lípidos biológicamente activos de lipoproteínas oxidadas. Un posible mecanismo de esta protección mediada por la PON1 contra la oxidación de lipoproteínas y la inflamación, podría residir en su capacidad de hidrolizar peróxidos lipídicos en lipoproteínas oxidadas, especialmente hidroperóxidos de fosfolípidos [113], así como el factor activador de plaquetas (PAF) [114] y otros fosfolípidos con estructura similar (*PAF-like*) que representan un elevado potencial inflamatorio.

El centro activo responsable de la actividad paraoxonasa/arilesterasa está relacionado, aunque es diferente al centro activo responsable de la protección a la oxidación. Este centro protector de la oxidación al parecer involucra la única cisteína libre de la PON1 (Cys 284) y no requiere del extremo N-terminal responsable de la unión a HDL [115].

El desarrollo de ratones deficientes en el gen de la PON1 ha revelado una relación entre expresión de la PON1 y la formación de lesiones arterioscleróticas. Los ratones PON1^{-/-} además de ser más susceptibles a los tóxicos organofosforados, como cabría esperar, son más susceptibles a la arteriosclerosis que sus controles no deficientes en el gen, cuando son sometidos a dieta aterogénica. Tanto las LDL como las HDL aisladas de los ratones PON1^{-/-} son más susceptibles a la oxidación que las lipoproteínas de sus controles, en ensayos *in vitro* [116]. Estos hallazgos han sido replicados al cruzar ratones deficientes en apoE y ratones deficientes en PON1 [117].

Existen factores que pueden afectar a la concentración y actividad del enzima. En ratones de la cepa susceptible a la arteriosclerosis C57BL/6J después de dieta

aterogénica se observa una disminución de la actividad PON1 en plasma, efecto que no se observa en ratones genéticamente resistentes a la arteriosclerosis de la cepa C3H/Hej. En ratones deficientes en apolipoproteína E se observa que al aumentar la edad, aumenta la peroxidación lipídica y disminuye de la actividad PON1 [118], mientras que la introducción de antioxidantes que evitan la oxidación de la LDL en la dieta de este mismo modelo de animal, preserva la actividad de la PON1 [119]. Estas observaciones sugieren que factores dietéticos y ambientales también modulan la actividad plasmática del enzima.

Por otra parte, se han clonado y expresado los productos de los genes de la PON2 y PON3, aunque al parecer estas enzimas tienen más importancia en los macrófagos que en las lipoproteínas [120], ya que la PON2 sólo se encuentra asociada a células y se ha encontrado aumentada en macrófagos con estrés oxidativo, por lo que podría ser una respuesta de defensa que evite la formación de células espumosas [121]. La PON3 se asocia a HDL en mucho menor proporción que la PON1 en humanos [122], y en estudios en ratones deficientes en PON1 se ha descrito que hay muy poca cantidad de PON3 en HDL de ratón [120]. La PON3, al menos en conejos, tiene una actividad protectora de la oxidación más potente que la PON1, habiéndose demostrado su actividad lactonasa, mientras que posee una actividad arilesterasa muy débil [123].

Acetilhidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH)

Es una serina esterasa independiente de calcio, asociada a LDL (especialmente las LDL densas de $1,050 < d < 1,063$ g/mL) y a HDL, en un 70% y 30%, respectivamente. La naturaleza de la unión de la PAF-AH a la LDL se ha estudiado a través de mutagénesis dirigida. Esta ha demostrado la importancia de los residuos 205, 115 y 116 de la PAF-AH y el extremo C-terminal de la apoB 100 de la LDL en esta unión. Esto ocurre en la LDL humana mientras que no hay asociación con la LDL en el ratón, donde la gran mayoría se asocia a HDL [124].

La PAF-AH actúa hidrolizando el enlace éster sn-2 del factor activador plaquetario (1-alquil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina, PAF), liberando acetato y lisofosfatidilcolina. Además esta enzima hidroliza los ácidos grasos peroxidados de los fosfolípidos de las LDL mínimamente oxidadas, y esta acción evita que las células endoteliales segreguen factores inflamatorios que promueven la unión de monocitos [125]. Los fosfolípidos oxidados podrían ser transferidos de LDL a HDL donde podrían ser inactivados por hidrólisis. Se ha demostrado que su acción en HDL podría prevenir la peroxidación de LDL, desapareciendo dicha prevención al utilizarse un inhibidor de serina esterasas, que inhiben a la PAF-AH [126]. Al parecer la PAF-AH y la PON1 actúan conjuntamente en la protección a la oxidación de las lipoproteínas, como sugiere el hecho de que la PAF-AH no es suficientemente efectiva previniendo la oxidación de LDL ratones deficientes en PON1 [116].

Glutación selenoperoxidasa plasmática (GPX3)

Este enzima pertenece a una familia de cuatro miembros descritos que tiene la característica de contener una selenocisteína en su centro activo. Las glutación selenoperoxidasas son tetraméricas, constando de cuatro subunidades idénticas, excepto la glutación selenoperoxidasa 4, que es monomérica. Las subunidades de la GPX3 tienen aproximadamente 23-25 kDa, y están glicosiladas, en concordancia con su localización extracelular. De hecho, la única glutación selenoperoxidasa descrita que no es citosólica es la GPX3. Se encuentra RNAm de este enzima principalmente en el riñón, y en menor medida en el corazón, placenta, pulmón, células gastrointestinales, tiroides e hígado [127].

La secuenciación de la GPX3 en humano y ratón y mostraron un 100% de homología, sugiriendo esta conservación un papel crítico en la supervivencia. Este enzima es capaz de reducir hidroperóxidos orgánicos como los de fosfolípidos, y se ha encontrado asociado a HDL en el plasma humano [128]. En base a esta capacidad protectora de compuestos derivados de la oxidación, se ha propuesto un papel en la protección del endotelio vascular de los efectos tóxicos de los

lípidos oxidados. Se ha descrito que la homocisteína inhibe a la GPX3, y esta inhibición se ha asociado al efecto nocivo que tiene este aminoácido sobre el endotelio y el riesgo a la arteriosclerosis [128].

Las determinaciones de esta actividad enzimática en tampón Tris, como se determinan las actividades GPX citosólicas, requieren de concentraciones milimolares de glutatión reducido. Sin embargo, en un tampón PBS este enzima puede actuar con concentraciones micromolares de glutatión, como las que se encuentran en el plasma. Esto es debido a que el tampón Tris inhibe la actividad de este enzima plasmático, pero no la de las GPX citosólicas.

5. Funciones de las HDL de potencial relevancia antiaterogénica.

Se han descrito numerosas funciones de las HDL que podrían tener relevancia fisiológica. Sin embargo, por el momento no hay datos que indiquen la contribución relativa de estas funciones a la capacidad antiaterogénica total de las HDL. A continuación, se tratan con mayor detalle dos de las funciones antiaterogénicas mejor conocidas de las HDL: el transporte reverso de colesterol y la protección de la modificación oxidativa de las lipoproteínas.

Transporte reverso de colesterol

Con esta denominación se hace referencia al proceso mediante el cual el colesterol captado por las HDL de las células periféricas, llega al hígado y es eliminado por las vías biliares. En los seres humanos esta captación hepática se realiza fundamentalmente a nivel de VLDL, lipoproteínas residuales tipo IDL, y LDL. El proceso por el cual los ésteres de colesterol pasan de HDL al grupo de lipoproteínas que contienen apoB (quilomicrones, VLDL, IDL y LDL) está mediado por la acción de la CETP. A continuación se analizan los tres procesos que componen este sistema, el eflujo de colesterol de las células al plasma, la

esterificación del colesterol y el destino metabólico de los ésteres de colesterol formados.

Eflujo de colesterol

Existen dos teorías sobre como se produce el eflujo de colesterol hacia las HDL. Una primera teoría propone que se trata de un proceso de difusión acuosa en el que el colesterol no esterificado pasa de las membranas celulares a aceptores moleculares como vesículas de fosfolípidos sin proteínas, ciclodextrinas sintéticas, albúmina y HDL tripsinizada. Este proceso es lento, receptor-independiente, no saturable y tiene poco efecto sobre los depósitos de colesterol esterificado intracelulares [129]. Este proceso puede ser bidireccional y la esterificación del colesterol por la LCAT prevendría la redifusión del colesterol desde la HDL hacia la membrana plasmática, aumentando así el eflujo neto de colesterol [130]. Las partículas de HDL que captan dicho colesterol no tienen ninguna especificidad característica (las HDL sólo con apoA-I, y las HDL con apoA-I y apoA-II son igualmente capaces de inducir este eflujo de colesterol) [131].

La expresión de SR-BI incrementa este eflujo de colesterol, facilitando la difusión de la membrana a los aceptores plasmáticos. Sin embargo este eflujo no refleja simplemente la unión de la HDL a la membrana, ya que el CD-36, que es otro receptor *scavenger*, también une HDL pero no aumenta el eflujo. Por tanto se sugiere que la unión de HDL al SR-BI facilita el flujo bidireccional pasivo entre la HDL y la membrana plasmática gracias a reorganizaciones de lípidos en los dominios ricos en colesterol y las caveolas en la membrana plasmática [132].

Una segunda teoría, propone que el eflujo de colesterol es receptor-dependiente y se ha descrito como un mecanismo de transporte rápido, específico, unidireccional, saturable, independiente de LCAT y que es eficiente reduciendo los depósitos de ésteres de colesterol del citosol celular. Este eflujo de colesterol y fosfolípidos requiere de aceptores específicos como apolipoproteínas (apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoE y apoCs) pero especialmente a una fracción minoritaria de

las HDL, las pre- β -HDL. Sin embargo, este tipo de partículas contienen solo apoA-I, y suponen sólo el 5% del total de las HDL. A través del estudio de la enfermedad de Tangier se descubrió que el receptor celular al que se asocia la apoA-I es el ABCA1 y, quizás a otros miembros del grupo de proteínas ABC [101].

El eflujo específico implica interacciones con proteínas de la membrana plasmática, con generación de señales intracelulares que provocan la translocación del colesterol del retículo endoplasmático, Golgi o endosomas hacia la membrana plasmática. Se ha descrito que las HDL y la apoA-I son internalizadas por macrófagos en el compartimiento endosomal desde donde son resecretadas juntamente con lípidos [133]. De hecho los macrófagos provenientes de enfermos de Tangier parecen tener un defecto en la resecretión, y las HDL internalizadas son dirigidas a los lisosomas. La contribución de la expresión del ABCA1 en macrófagos en el colesterol de HDL es muy bajo y al parecer la contribución mayor proviene de la expresión de ABCA1 en hepatocitos [134]. Sin embargo la expresión de ABCA1 en macrófagos se ha apuntado como un factor importante en la aterogénesis, independiente del colesterol de HDL, al permitir que los macrófagos eliminen el exceso de colesterol evitando así que se transformen en células espumosas. De hecho, se ha descrito un incremento de reclutamiento de macrófagos deficientes en ABCA1 en la pared arterial de ratones *knockout* de receptor de LDL [135].

Actualmente se acepta que los dos tipos de procesos pueden coexistir, y que en algunos tipos celulares el eflujo de colesterol se llevaría a cabo utilizando los dos sistemas, mientras que en otros uno de los sistemas de eflujo sería mayoritario.

Esterificación del colesterol

El proceso de esterificación de colesterol en el plasma se produce únicamente por la acción de la LCAT. La deficiencia completa de LCAT no parece repercutir igual en todos los tejidos del organismo. Además, hay evidencias experimentales que indican que la actividad LCAT no es necesaria para que se produzca el

componente rápido y específico del eflujo de colesterol mediado por ABCA1 que va dirigido en primer lugar a partículas de pre- β HDL. Sin embargo, la actividad LCAT parece ser necesaria para el componente más lento e inespecífico del eflujo de colesterol, que va dirigido a las partículas de HDL de forma dependiente principalmente de su concentración.

Destino de los ésteres de colesterol formados en HDL

El destino de los ésteres de colesterol formados en HDL es variado. Los ésteres de colesterol pueden ser captados de forma específica de las HDL tras unión de éstas al receptor SR-BI (este proceso no implica captación de la partícula de HDL por la célula, las HDL se “vacían” de ésteres de colesterol) en hígado, gónadas y glándulas suprarrenales, siendo ésta, al parecer la vía principal de transferencia de colesterol al hígado. En esta vía recientemente se ha descrito que la carboxi-éster lipasa colocaliza con el SR-BI y podría actuar hidrolizando los ésteres de colesterol que éste capta, para ser incorporados a los hepatocitos [136].

Pueden ser captados por los tejidos junto con la totalidad de la partícula de HDL, a través del receptor LRP de manera minoritaria especialmente en hígado y riñón. Se ha identificado la cadena β de la ATP sintasa [6] como receptor de apoA-I que media la endocitosis de la partícula de HDL en hepatocitos, aunque por el momento se desconoce la relevancia y el mecanismo por el cual un componente del complejo de síntesis de ATP mitocondrial media la captación de HDL.

Otra vía de catabolismo de los ésteres de colesterol es que éstos pueden ser transferidos por la CETP a partículas que contienen apoB-100, y más tarde captados junto a éstas por las células vía receptor-dependiente (receptor de LDL, receptor de VLDL, el LRP, etc.).

Prevención de la modificación oxidativa de las LDL.

Un aspecto que está despertando un interés creciente a la hora de explicar la capacidad antiaterogénica de las HDL es su capacidad de inhibir la modificación

oxidativa de las LDL, un fenómeno que parece básico para la génesis de la arteriosclerosis [137,138]. El papel central de la LDL en la aterogénesis es, en parte, debido a que al entrar al espacio subendotelial estas partículas quedan retenidas en una matriz compleja de proteoglicanos. De hecho, se encuentra el doble de concentración de apoB en la pared arterial que en plasma mientras que la HDL no se retiene y la concentración de apoA-I en la pared es 10-20% de la que se encuentra en plasma [139].

Navab y colaboradores demostraron que las LDL contienen pequeñas cantidades de hidroperóxidos derivados de la vía de las lipooxigenasas que pueden ser potencialmente iniciadores de la oxidación (“*seeding molecules*”). La apoA-I es capaz de recoger estos hidroperóxidos de las LDL *in vitro*, y también *in vivo* después de la infusión de apoA-I a ratones y en humanos [140]. Basándose en estos estudios y utilizando un modelo de pared arterial *in vitro* se propuso un modelo en el cual las LDL son retenidas por la matriz subendotelial, donde reciben hidroperóxidos adicionales provenientes de las células de la pared, sobre todo derivados de los ácidos linoleico (HODEs) y araquidónico (HETE)s. Este proceso de transferencia parece estar mediado por ABCA-I ya que al bloquear esta proteína en células de la pared arterial éstas no eran capaces de inducir la oxidación de la LDL [141].

Cuando el nivel de lípidos oxidados de la LDL excede un determinado límite se forman de manera no enzimática fosfolípidos oxidados con propiedades proinflamatorias [142], derivados de fosfatidilcolina. Algunos de los fosfolípidos con actividad biológica proinflamatoria descrita son el POVPC (1-palmitoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosfocolina), el PGPC (1-palmitoil-2glutaril-sn-glicero-3-fosfocolina) y el PEIPC (1-palmitoil-(5,6-epoxiisopropano E2)-sn-glicero-3-fosfocolina) [143]. Estos fosfolípidos oxidados en la pared arterial posteriormente iniciarían toda la cascada de eventos inflamatorios que darían lugar a la formación de la estría grasa y a la lesión arteriosclerótica. Las LDL oxidadas perderían afinidad por el receptor de LDL y sólo serían aclaradas por los receptores *scavenger*

de los macrófagos. Estos eventos y las acciones preventivas propuestas para la HDL se representan con detalle en la [Figura I-4](#).

Se ha demostrado que la HDL normal es capaz de extraer e inhibir la actividad de los lípidos oxidados de la LDL, evitar que las células de la pared arterial transfieran más especies reactivas a las LDL retenidas, inactivar los fosfolípidos oxidados proinflamatorios que se hayan formado en las LDL oxidadas, bloqueando la oxidación de la LDL a diferentes niveles [143]. Además de estas propiedades está bien descrito el efecto de las HDL de bloquear la inflamación en células endoteliales. Está aceptado que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por una acumulación de macrófagos y linfocitos T en la íntima arterial. En un paso inicial de este proceso inflamatorio es la adhesión de monocitos a células endoteliales a través de moléculas de adhesión y quimiotácticas. Las HDL tienen la capacidad de inhibir la quimioquinas y moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales [139], aunque el mecanismo exacto aún no está claro. Esta característica puede tener potencialmente una gran importancia como mecanismo protector de las HDL para evitar la inflamación y mantener la funcionalidad del endotelio.

Aunque se han descrito propiedades antioxidantes de la apoA-I y la apoA-II [144] se cree que al menos una parte importante de la capacidad antioxidante de las HDL es debida a enzimas que tiene asociados. Éstos son capaces de convertir productos de los ácidos grasos oxidados con propiedades inflamatorias en otros que no tienen actividad biológica, como se ha descrito para las paraoxonasas y la PAF-AH, [113,126], aunque también se ha sugerido para la LCAT [82] y la glutatión selenoperoxidasa plasmática [128].

La respuesta de fase aguda es un estado sistémico de respuesta a infección, cirugía, infarto de miocardio o inflamación. En esta situación se produce un cambio en la composición proteica de las HDL, apareciendo proteínas como la ceruloplasmina y proteína amiloide sérico A que podrían desplazar a la ApoA-I y

producir disminuciones en la actividad paraoxonasa y PAF-AH [64,145]. En hámster se ha demostrado que la respuesta a fase aguda inducida por el lipopolisacárido produce una disminución tanto de actividad plasmática como del RNA mensajero de la paraoxonasa. Esta última está mediada por las citoquinas proinflamatorias TNF- α y IL-1- β [146]. Este fenómeno puede ser un factor de riesgo que relacione la respuesta a fase aguda (y también la inflamación crónica) con una mayor susceptibilidad a la aterogénesis.

Las HDL son el principal grupo lipoproteico donde se acumulan ésteres de colesterol con hidroperóxidos [147] y se sabe que los mismos son aclarados 8 veces más rápidamente que los ésteres de colesterol de HDL sin modificar por cultivos de células de hepatomas [148], sugiriendo que una de las propiedades antioxidantes/antiinflamatorias de las HDL es mediado por un mecanismo de transporte de estos hidroperóxidos para su metabolismo en el hígado .

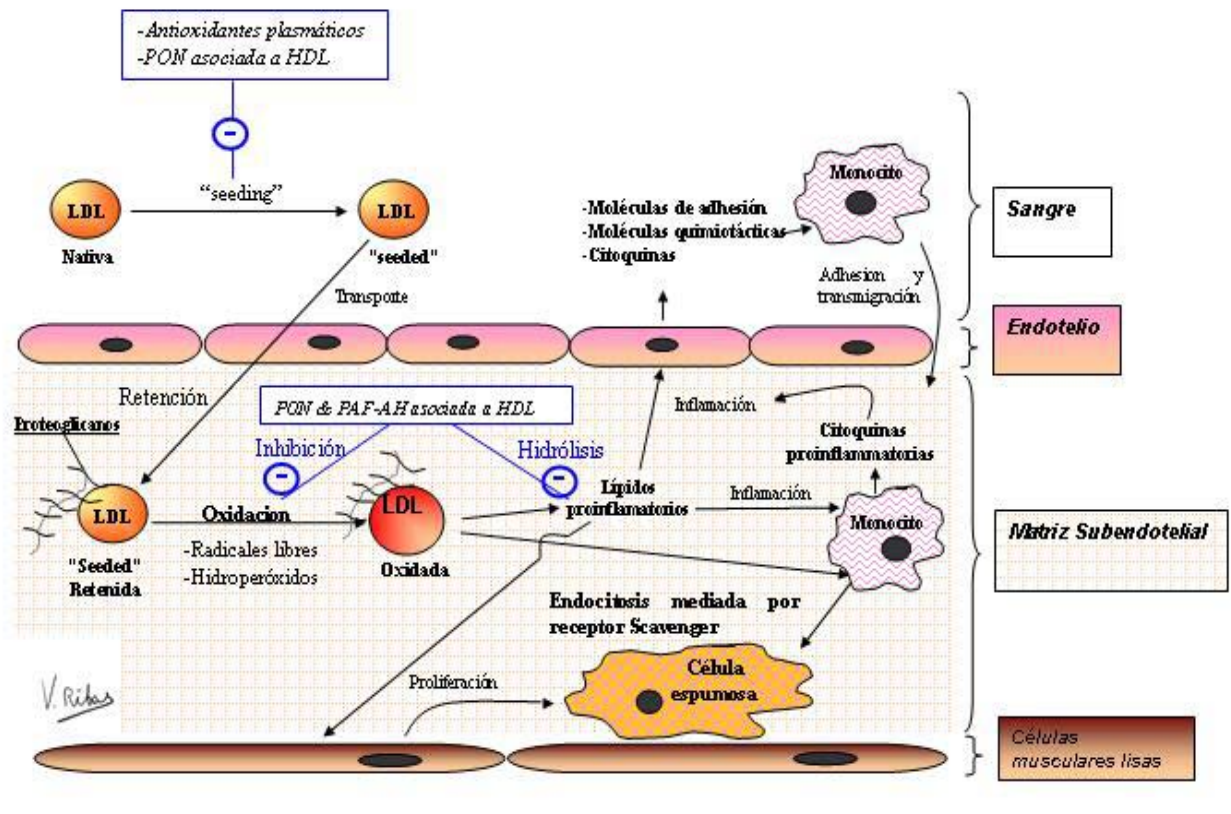


Figura I-4. Modelo para la oxidación de la LDL por las células de la pared aórtica.

La LDL adquiere hidropéroxidos en la circulación (está “sembrada” de moléculas iniciadoras de la oxidación, “*seeding*”), en intercambios de lípidos con otras lipoproteínas o bien al entrar en la matriz endotelial y volver a la circulación. Los antioxidantes solubles del plasma y las HDL podrían evitar la adquisición o inactivar estas moléculas iniciadoras de la oxidación. Cuando las LDL quedan atrapadas en los proteoglicanos de la matriz subendotelial, estas LDL pueden adquirir más moléculas iniciadoras de la oxidación, provenientes de especies reactivas de oxígeno (ROS), hidropéroxidos, productos de las vías de las lipooxigenasas y mieloperoxidasas. Cuando el nivel de estas moléculas en las LDL llega a un determinado umbral se puede producir un proceso de oxidación no enzimático que genera lípidos con capacidad proinflamatoria, especialmente fosfolípidos. Estos lípidos oxidados estimulan la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de quimiocinas que atraen a monocitos y éstos transmigran a través del endotelio. Los monocitos en la matriz subendotelial pueden transformarse en macrófagos, fagocitar LDL modificadas y secretar citoquinas que provocan la migración de células musculares lisas. Las HDL son capaces de bloquear la oxidación de la LDL, la respuesta inflamatoria en el endotelio gracias a sus enzimas asociados y por tanto evitar los primeros pasos en la génesis de la estria grasa.

Objetivos

Las proteínas más abundantes de HDL son la apoA-I y la apoA-II. La concentración plasmática de apoA-I está inversamente relacionada con el riesgo de enfermedad coronaria y su papel en las HDL es bien conocido. La apoA-I tiene un papel estructural muy importante en las HDL, interacciona con receptores de la HDL provocando el eflujo de colesterol de membranas celulares y es cofactor de la LCAT. En cambio, el papel que juega la apoA-II en el metabolismo lipoproteico y en el desarrollo de la arteriosclerosis es menos conocido.

Varias líneas de ratones transgénicos para la apoA-II humana fueron desarrolladas y caracterizadas con el objetivo de conocer el papel de esta apolipoproteína en el metabolismo de lipoproteínas y arteriosclerosis [33]. La línea de ratones transgénicos con más expresión de apoA-II humana (línea 11.1) alimentada con dieta aterogénica (rica en colesterol y con colato sódico) desarrolló hiperlipemia combinada, deficiencia de HDL y aumento de susceptibilidad a la arteriosclerosis [149,150]. Para conocer mejor los mecanismos que provocan el aumento de susceptibilidad a la arteriosclerosis, se planteó el estudio de las propiedades antiaterogénicas de las HDL de estos ratones. Por tanto, los objetivos que nos propusimos en este estudio fueron los siguientes:

1. Determinar la capacidad de las HDL de ratones transgénicos de apoA-II humana de proteger frente a la oxidación a las lipoproteínas con apoB.
2. Determinar la capacidad de transporte reverso de colesterol específico de macrófagos inducido por las HDL de ratones transgénicos de apoA-II humana.

Material y métodos

1. Animales

Se utilizaron dos líneas de ratones C57BL/6, transgénicos para el gen de la apoA-II humana y ratones control no transgénicos de la misma cepa. Estas dos líneas de transgénicos difieren en cuanto a su nivel de expresión de apoA-II h: la línea 25.3 presenta unos niveles de apoA-II h menores de 20 mg/dL mientras que la línea 11.1 presenta unas concentraciones de apoA-II humana en dieta aterogénica alrededor de los 120 mg/dL [33]. Estos animales son mantenidos en una dieta aterogénica (70% pienso estándar, 14% aceite de coco, 3,5% de colesterol y 1,5 % colato sódico) entre dos y cinco meses. Para obtener sangre de estos ratones en ayunas, se les retiró la comida por la tarde de el día anterior a la extracción, y ésta se realizó por la vena de la cola previa anestesia, utilizando heparina como anticoagulante, centrifugando posteriormente la sangre a 12.000 rpm 10 minutos a 4°C. En el sacrificio se anestesió al animal, se extrajo sangre por punción cardiaca y se procedió a la extracción de órganos.

Los protocolos de manipulación de animales para este estudio fueron aprobados por el Comité Ético del Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau el 6 de abril del 2000, y autorizados por el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya el 9 de agosto del 2000, con el número de autorización 1597.

2. Inmunohistoquímica y cuantificación de lesión arteriosclerótica en aorta

El corazón y la aorta proximal fueron extraídas y sumergidas en salino, e inmediatamente fijadas en una solución de paraformaldehído 4% con EDTA 1 mM y BHT 20 µM (butiril hidroxitolueno) para evitar oxidación, durante 1 hora y en PBS-sacarosa 5% (PBS tampón fosfato-salino: NaCl 14 mM, KCl 0,27 mM, Na₂HPO₄ 0.65 mM, KH₂PO₄ 0.15mM, pH 7,4) con EDTA y BHT durante 18 h. Los

corazones fueron montados en compuesto OCT (Tissue-Tek, Sakura) y congelados a -80°C . Se realizaron secciones de $10\ \mu\text{m}$ de grosor con un criostato, a través del seno aórtico y estas secciones fueron incubadas con anticuerpos monoclonales conjugados con biotina. Los anticuerpos primarios son el MDA2, dirigido contra LDL modificada con MDA y el NA59 dirigido contra LDL modificada con 4-hidroxinonanal [151,152], ambos cedidos por el Dr. Joseph Witztum de la University of California San Diego. Brevemente, las secciones fueron pretratadas en acetona, aclaradas en tampón Tris-salino (TBS) (20mM Tris-HCl, 0,5 M Cl Na pH 7,5), y bloqueadas con albúmina al 2% en TBS a 37°C durante una hora. Las secciones fueron incubadas a continuación con una dilución 1/30 del anticuerpo primario durante 2 h a 37°C , lavado con TBS- 0,025% Triton X-100, e incubado una hora con un complejo estreptavidina- fosfatasa alcalina. Las secciones se lavaron con TBS y se revelaron con NBT-BCIP con levamisol (Pierce). Tres secciones consecutivas fueron teñidas con MDA2, NA59 o sin anticuerpo y la cuarta sección fue teñida con Oil Red O y hematoxilina [150]. Al menos dos de estas series fueron utilizadas en cada animal estudiado.

La tinción con Oil Red O (ORO) se llevó a cabo sumergiendo la sección de aorta en isopropanol durante 2 segundos, posteriormente pasado a la solución de ORO durante 10 minutos (solución ORO: 1,5 g de Oil Red O/L en 60% isopropanol), lavando unos segundos en isopropanol y posteriormente en agua. Posteriormente se realiza la tinción sumergiendo la sección en hematoxilina (7,5 g/L Accustain, Sigma diagnostics) durante 5 minutos y aclarando con agua. Tanto las inmunohistoquímicas como las tinciones con ORO-hematoxilina se montaron con glicerol-gelatina para su observación y conservación. La solución glicerol-gelatina (4g de gelatina, 21 mL de agua, 25 mL glicerol, 5 mL de fenol) se calentó con agitación hasta su fusión y se añadió sobre la preparación, cubriendo con un cubreobjetos.

3. Lípidos y lipoproteínas

Parámetros lipídicos y apolipoproteínas.

La medida de colesterol total, colesterol de HDL (medido por precipitación de lipoproteínas de apoB con MgCl₂-fosfotúngstico, Roche diagnostics), colesterol libre, triglicéridos, glicerol (Roche Diagnostics), fosfolípidos y ácidos grasos no esterificados (Wako), se realiza mediante métodos enzimático-colorimétricos y para apoB humana (Roche Diagnostics, y apoA-II humana (Wako) se utilizan métodos inmunturbidimétricos, adaptados a un autoanalizador Hitachi 911. La concentración de proteínas es determinada por el método de Bradford [153], a través de un kit comercial (Bio-Rad).

Aislamiento de lipoproteínas.

El aislamiento de lipoproteínas plasmáticas se realizó por ultracentrifugación secuencial. Las diferentes fracciones lipoproteicas (VLDL < 1.006 g/mL, IDL 1.006<d<1.019 g/mL, LDL 1.019<d<1.063 y HDL 1.063<d<1.210 g/mL) se obtienen ajustando con KBr las soluciones o el plasma a la densidad a la que flota la fracción lipoproteica de interés, habiendo hecho flotar previamente la fracción de densidad menor [154]. El cálculo de la cantidad de KBr para ajustar una solución a la densidad deseada se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{KBr (gramos)} = [(\text{mL muestra}) * (\text{dens final-dens inicial})] / [(1-(0,312*\text{dens final})]$$

Las LDL humanas fueron así obtenidas y congeladas en alícuotas con 10% de sacarosa para mantener sus propiedades estructurales y funcionales [155]. Las HDL de las distintas líneas de ratones se obtuvieron utilizando un método rápido con un rotor vertical (NVT-65, Beckman), con pasos de aceleración y deceleración lentos [156]; haciendo flotar las lipoproteínas con apoB (ajustar a 1,063 g/mL, 55000 rpm 5 h 10°C) y posteriormente haciendo flotar las HDL (ajustar a 1,210 g/mL 55000 rpm 18 h 4°C). Las soluciones de densidad utilizadas para aislar HDL

no contienen EDTA y además tienen 1 mM de Cl_2Ca para evitar inactivar la PON1, ya que la estabilidad de esta actividad es calcio dependiente [111].

Cromatografía de gelfiltración (*Fast protein liquid chromatography, FPLC*)

Las lipoproteínas también fueron aisladas a través de cromatografía de gelfiltración en un sistema FPLC, usando una columna Superosa 6 (Pharmacia). Este sistema separa las partículas de la muestra en función de su tamaño, saliendo antes las partículas mayores y retrasando las más pequeñas. Para la separación se inyectaron 0,2 o 0,5 mL de muestra en la columna, eluyendo con un flujo de 0,5 mL / min, recogiendo fracciones a cada minuto (fracciones de 0,5 mL) y siguiendo la absorbancia a 280 nm para determinar los picos de proteína correspondientes a las diferentes lipoproteínas o proteínas plasmáticas. Los tampones utilizados en la cromatografía fueron Tris-HCl 20 mM pH 8,0, 2 mM Cl_2Ca en la mayoría de ensayos o tampón PBS en la determinación de glutatión selenoperoxidasa.

4. Actividades enzimáticas

Paraoxonasa 1 (PON1)

La paraoxonasa 1 (PON1) se midió utilizando su actividad arilesterasa, medida a través de la hidrólisis de fenilacetato [157]. Esta hidrólisis se monitorizó adicionando la muestra a analizar (suero o lipoproteínas aisladas) a un tampón 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM Cl_2Ca y 3 mM de fenilacetato midiendo el aumento de absorbancia a 270 nm durante 3 minutos a 25°C en cubetas de cuarzo en un espectrofotómetro Biochrom 4060 equipado con un intercambiador de siete cubetas termostalizadas (Pharmacia LKB). La PON1 es un enzima calcio dependiente, siendo inhibida irreversiblemente al adicionar EDTA [111]. Debido a que en el suero de ratón se encontró actividad arilesterasa EDTA-resistente y por tanto no atribuible a la PON1, en concordancia con recientes estudios [158], se calculó la actividad paraoxonasa (PON1) como la diferencia entre arilesterasa total y la arilesterasa EDTA-resistente. Esta última fue medida sustituyendo el Cl_2Ca en

el tampón de ensayo por 1mM de EDTA. También se midió la actividad resistente a PMSF (fenil-metil-sulfonil fluoruro), ya que el PMSF inactiva las carboxilesterasas, preincubando la muestra en 1mM de PMSF durante 5 minutos a 25°C y midiendo la actividad arilesterasa de manera habitual. La ϵ_{270} para la reacción fue $1.310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad (U) de actividad arilesterasa equivale a 1 nmol de sustrato transformado por minuto.

Acetilhidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH)

La determinación de la actividad PAF-AH se realizó con un kit comercial (Cayman Chemical). La base del kit consiste en que la PAF-AH hidroliza un sustrato artificial, el 2 tio-PAF (a 200 μM) en un tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,2 1 mM EGTA, liberando acetato y lisofosfatidilcolina con un grupo sulfidriilo libre que es detectado mediante una reacción con DTNB (5,5'-ditiobis del ácido 2-nitrobenzoico), incubando entre 2 y 10 minutos a 37°C, midiendo el incremento de absorbancia a 405 nm en un lector de placas elisa (AD/LD 340, Beckman Coulter) con una ϵ_{405} para el DTNB de $12.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad (U) de actividad PAF-AH equivale a 1 nmol de sustrato transformado por minuto.

Lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT)

La actividad exógena de la LCAT se determina frente a un sustrato artificial [33] y es reflejo de la cantidad de enzima. Para realizar esta determinación se prepararon proteoliposomas con 21,5 nM de $[7(n)\text{-}^3\text{H}]$ colesterol (Amersham), 2,5 μM de β -palmitoyl- γ -oleyl L- α -fosfatidilcolina (Sigma), 10 μM de colesterol no esterificado y 0,142 mg/mL de apoA-I pura de ratón en tampón tampón Tris-salino (TBS). Se emulsionaron estos componentes en tampón TBS con 10% colato sódico para facilitar la emulsión. En el tubo de reacción se incubaron 120 μl de este sustrato con la muestra (10 μL plasma o 70 μL de fracciones de FPLC) en TBS con 1 mM DTT y 0,25 mg/mL de albúmina (200 μl de volumen total) durante 1h a 37°C. Posteriormente se paró la reacción con 0,5 mL de metanol:hexano (1:2) de los cuales se separó la fase superior (0,5 mL), que contiene el colesterol (libre y

esterificado). De esta fase se separó el colesterol libre del esterificado por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando hexano/dietiléter/etil acetato (50/50/1,5) como fase móvil, revelando las bandas de lípidos con yodo gaseoso y se contó la banda correspondiente a ésteres de colesterol. Una unidad (U) de actividad LCAT equivale a 1 nmol de colesterol esterificado por hora.

Glutación selenoperoxidasa plasmática (GPX3)

La actividad GPX3 fue medida mediante un ensayo espectrofotométrico [128] desarrollado a partir de un kit para determinar GPX citosólica, cambiando las condiciones y adaptándolo a un lector de placas y a las muestras de ratón. En un pocillo que contenía 0,5 mM NADPH, 4,6 mM de glutación reducido y 1,1 unidades de glutación reductasa en tampón fosfato-salino (PBS), y adicionando de 2,5 a 20 μ L de muestra (plasma o fracción de FPLC), se iniciaba la reacción con 0,44 mM de tert-butil hidroperóxido (todos los reactivos de Sigma) en un volumen final de 225 μ L, y se monitorizó la disminución de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en un lector de placas (AD/LD 340, Beckman Coulter). La actividad se corrigió por blancos sin enzima y por la tasa de hidrólisis espontánea de NADPH sin tert-butil hidroperóxido medida durante 2 minutos. La ϵ_{340} para el NADPH es de 6.220 M⁻¹ cm⁻¹. Una unidad (U) de actividad glutación selenoperoxidasa equivale a 1 μ mol de NADPH oxidado por minuto.

5. Marcadores de estrés oxidativo y vitaminas antioxidantes.

Para estas determinaciones se utilizaron muestras de sangre extraídas mediante punción cardiaca recogidas en tubos que contenían EDTA y BHT.

Determinación de 8-isoprostano

El 8-isoprostano de plasma (libre y esterificado) fue determinado utilizando un enzimoimmunoensayo (EIA) comercial (Cayman Chemical). El ensayo se basa entre la competición entre el 8-isoprostano de la muestra y 8-isoprostano-

acetilcolinesterasa conjugado por una concentración limitada de anticuerpo anti 8-isoprostano. La unión de 8-isoprostano conjugado con el anticuerpo se une a un segundo anticuerpo unido al pocillo, y después el 8-isoprostano unido al pocillo es detectado a través de una reacción con DTNB que absorbe a 405 nm que es hidrolizado por la acetilcolinesterasa del conjugado. La magnitud de la señal es inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano (no conjugado) de la muestra.

De las muestras de plasma en primer lugar se realizó una extracción y posteriormente una determinación por EIA. En la extracción las muestras de plasma (1 mL) se incubaron con 1 mL de KOH 15% durante 60 minutos a 40°C para hidrolizar los ácidos grasos. Se añadieron 2 mL de etanol con 0,01% BHT, agitando vigorosamente y centrifugando a 3000 rpm 10 minutos para precipitar las proteínas, se evaporó el etanol y se purificó la muestra con una columna SPE C-18, eluyendo la muestra con etil acetato. Después de evaporar el etil acetato se resuspendió la muestra con el tampón de EIA y se determinó la cantidad de 8-isoprostano por EIA basado en el principio descrito más arriba.

Medida de TBARS

El ácido tiobarbitúrico reacciona con los peróxidos lipídicos en condiciones de pH ácido y temperatura elevada dando lugar a un pigmento rojo. Los productos de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico son los aldehídos y las cetonas, especialmente el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal. Las especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el plasma se midieron como está descrito [159]. El plasma (75µL) o el patrón se diluyó con 175 µL de agua y se añadió 0,5 mL de reactivo TBARS incubándose a 80°C durante 30 minutos, parando la reacción en hielo. Después de centrifugar 10 minutos a 10000 rpm se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm , comparándose las absorbancias con una recta patrón con concentraciones de MDA conocidas, generadas con tetrametoxipropano.

Determinación de vitaminas antioxidantes

Para la detección de compuestos liposolubles (tocoferol, retinol, carotenos, licopenos) se utilizó cromatografía isocrática en HPLC de fase reversa [160] . En primer lugar se realizó una extracción lipídica de la muestra para lo cual se adicionaron 0,5 mL de estándar interno (tocoferol acetato en etanol a 10 µg/L) a 0,5 mL de muestra, agitando continuamente. A esta mezcla se le añadió 1 mL de heptano con 20 µM de BHT en agitación continua y vigorosa, y posteriormente se centrifugó para separar dos fases. La fase superior conteniendo los lípidos se extrajo y se secó bajo corriente de nitrógeno gas. Se reconstituyó la fracción lipídica con 40 µL de acetonitrilo-tetrahidrofurano (1:1 v/v) y 5 µL se sometieron a cromatografía en una columna de fase reversa (columna Ultrasphere ODS 0,46X25 cm, 5 µm, System Gold, Beckman) con un flujo de 0,4 mL/minuto con una fase móvil de acetonitrilo/agua/tetrahidrofurano (81.3/5.7/13). La detección del tocoferol y los carotenoides fue medida de manera simultánea a 290 y 450 nm. Posteriormente se cuantificó el área bajo la curva de los picos de los antioxidantes y se calculó respecto área del pico del estándar interno, de concentración conocida.

6. Ensayos de oxidación en lipoproteínas

La capacidad de las HDL de las diferentes líneas de ratones de inhibir la oxidación de la LDL se evaluó realizando incubaciones de LDL + HDL, y midiendo posteriormente el grado de oxidación de las lipoproteínas después de una incubación en condiciones oxidantes. Las lipoproteínas, aisladas por ultracentrifugación fueron dializadas en el tampón de trabajo y utilizadas inmediatamente en los ensayos descritos a continuación

Migración electroforética

Las lipoproteínas al ser oxidadas cambian su carga, pudiendo por tanto medir el grado de oxidación de una lipoproteína gracias a su cambio de movilidad electroforética. En estos ensayos se incubaron LDL humanas a una concentración de 0,3 mM fosfolípidos (equivalente a 1 mM colesterol y 250 mg/L de apoB) con

5,5 μM CuSO_4 y en presencia o ausencia de 0,4 mM de fosfolípidos de HDL de las diferentes líneas de ratones. Después de realizar esta incubación durante 2 h y 30 minutos a 37°C se paró la oxidación con EDTA para quelar el Cu^{++} y BHT (1 mM y 20 μM de concentraciones finales, respectivamente), y se aplicaron en un gel de agarosa (10 μL). Para la electroforesis se utilizan geles de agarosa comerciales (Biomidi) a 90V durante 35 minutos. Después de la electroforesis se realizó una tinción específica de lípidos con Negro Sudán se analizó de la movilidad electroforética relativa de las bandas correspondientes a la LDL utilizando el densitómetro Gel Doc 2000 y el software Quantity One (Biorad).

Determinación de hidróxidos de ácidos grasos

Durante el proceso de oxidación se forman hidroperóxidos de ácidos grasos que al descomponerse dan lugar a hidróxidos de estos ácidos grasos, entre otros compuestos, pudiéndose medir la cantidad de hidróxidos como reflejo del nivel de oxidación de una partícula lipoproteica. Después de la incubación descrita en el apartado anterior se extraen los lípidos de las lipoproteínas con éter-hexano 1:1 en presencia de antioxidantes. Los extractos se hidrogenan catalíticamente en presencia de PtO_2 , y una vez hidrogenados se saponifican los ésteres en presencia de KOH 1N 30 minutos a 60°C. Los ácidos mono hidroxilados se prepurifican mediante una extracción en fase sólida en fase inversa (C-18, SePak, Waters), según instrucciones del fabricante. La fracción conteniendo los ácidos mono hidroxilados, en especial los derivados del ácido linoleico se someten a análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) después de la formación de trimetil-silil-derivados de los correspondientes metil-ésteres [160].

Monitorización de formación de dienos conjugados

Al incubar lipoproteínas en presencia de un catalizador de la oxidación se produce una reestructuración de los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que dan lugar a la formación de dienos conjugados (dobles enlaces alternados con enlaces simples) y esta estructura puede ser detectada por su absorbancia a 234 nm [160]. Durante la oxidación se pueden

distinguir varias fases: la fase de latencia (*lag phase*) en la cual las defensas antioxidantes de la lipoproteína actúan y la oxidación es lenta, posteriormente hay una fase exponencial o de propagación donde la oxidación ocurre de manera rápida. Posteriormente al agotarse los sustratos oxidables de la lipoproteína se llega a un máximo a partir del cual hay una fase de descomposición donde estos dobles enlaces se descomponen dando lugar a productos finales de la oxidación (peróxidos, hidróxidos, aldehídos y cetonas) [161].

El seguimiento de la cinética de oxidación a través de la formación de dienos conjugados se realizó incubando LDL a 0,1 mM de fosfolípidos (equivalente a 75 $\mu\text{g apoB / mL}$, o 0,3 mM colesterol) con 2,5 $\mu\text{M CuSO}_4$ durante 4 h a 30°C en un espectrofotómetro Biochrom 4060 equipado con un intercambiador de siete cubetas termostalizadas (Pharmacia LKB). En las mezclas LDL+HDL se estudió la cinética de oxidación de estas lipoproteínas por separado para discernir la oxidación de la LDL de las mezclas, restando la cinética de oxidación de HDL a la cinética LDL+HDL.

Monitorización de la fluorescencia de DCF

El compuesto diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Sigma) emite fluorescencia al reaccionar con especies reactivas del oxígeno. En este ensayo un sustrato oxidable (LDL humana) es incubada junto con DCF y transcurrido un tiempo se mide la fluorescencia que la oxidación de las LDL ha producido sobre el DCF. Las HDL al evitar la oxidación de la LDL evitan también la aparición de la fluorescencia, pudiendo medir así su capacidad antioxidante [162]. El ensayo se realizó en microplacas de fluorímetro negras (Nunc) con 3 μg de apoB de LDL humana, 2 nmoles de fosfolípidos de HDL y 2 μg de DCF por pocillo en salino con 0,02% de azida en un volumen final de 150 μL . Después de un tiempo de incubación de 3 h a 37°C se midió la fluorescencia con λ de excitación de 485 nm y λ emisión de 530 nm.

7. Cuantificación de RNA mensajeros

El RNA total de hígado fue extraído utilizando el reactivo Trizol (Gibco/BRL) y fue repurificado on columnas RNAeasy (RNAeasy mini kit, Quiagen), para evitar la presencia de DNA genómico. La transcripción reversa se llevó a cabo con 2 µg de RNA total en un volumen final de 25 µL durante 1 h at 42°C, utilizando transcriptasa reversa M-MLV (H-) (Promega, Madison WI) utilizando como cebador un oligo dT. El análisis cuantitativo de los diferentes RNA se realizó con PCR a tiempo real en un aparato Abi Prism 7000 (Applied Biosystems). La expresión de los RNAm de los genes seleccionados se estudió utilizando ensayos que utilizan una sonda específica marcada con fluorescencia y unos oligonucleótidos específicos. Estos ensayos son comerciales y están prediseñados y validados (Assays-on-Demand, Applied Biosystems).

8. Incubaciones de HDL con apoA-II humana pura e inmunodetección

Con el objetivo de reproducir , aunque fuera parcialmente, la composición de la HDL de los ratones transgénicos de 11.1, concentraciones crecientes de ApoA-II humana pura (Sigma) fue incubada con plasma o HDL de ratones control en dieta aterogénica. Estas incubaciones se realizaron a 37°C o bien a 4°C durante 3 h con agitación suave, al cabo de las cuales se determinaron las actividades PON1 y PAF-AH, se sometió a cromatografía por FPLC o se realizó la inmunodetección de PON1 como se describe a continuación.

La PON1 fue determinada por *Western Blot*. Para ello se realizó una electroforesis nativa en gradiente de poliacrilamida (GGE, 4-20% poliacrilamida , Biorad) en tampón Tris-Glicina (Tris 24 mM, glicina 190 mM) durante 4 h a 120 V a 4°C. En la carrera electroforética se utilizaron marcadores de proteínas nativas con el diámetro indicado en los esquemas. Las proteínas del marcador son tiroglobulina 17 nm, ferritina 12,2 nm, catalasa 10,4 nm, lactato deshidrogenasa 8,1

nm y albúmina 7,1 nm (HMW Native Marker Kit, Amersham). Inmediatamente después se realizó una transferencia a membrana de PDVF (Biorad) en tampón Tris-glicina con 20% metanol, durante 60 minutos a 60 V a 4°C. Después del bloqueo 18 h a 4°C (*Western Blocker solution*, Sigma), se realizó la inmunodetección, utilizando un antisuero de cabra inmune para la PON1 de ratón [163] (cedido por la Dra. Trudy Forte, University of California Berkeley) a dilución 1/2.000 en tampón de bloqueo-TTBS (1:1). Se realizaron lavados con TTBS (0,01% de Tween 20 en TBS), incubado con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa anti IgG de cabra (Sigma) (1/10.000 en tampón de bloqueo), y revelado con un sistema quimioluminiscente, bien por revelado con films fotográficos o en el sistema Chemidoc XRS (Biorad).

La apoA-I de ratón en fracciones FPLC se detectó después de una electroforesis desnaturizante y reductora (geles 0,1% SDS- 15% PAGE) y *Western Blot* de manera análoga a como se describe más arriba, con un antisuero de conejo contra la apoA-I de ratón(1/5000) y un secundario anti igG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma) (1/10000). La cantidad de apoA-I fue calculada como intensidad relativa a la intensidad densitométrica de la banda de apoA-I pura de concentración conocida corrida en el mismo gel. Las bandas fueron evaluadas utilizando el densitómetro Gel doc 2000 y el software Quantity one (Biorad).

9. Determinación de parámetros fecales y absorción intestinal de colesterol

La absorción de colesterol se midió mediante un método [164] en el que se administran por vía oral colesterol [C^{14}] y sitostanol [3H], en una proporción conocida y se determina la proporción [C^{14}] / [3H] en las heces. El sitostanol actúa como control interno ya que no es absorbido en el intestino pero tiene una estructura similar a la del colesterol. Para realizar este experimento se preparó una solución de 16 μCi [5,6- 3H] sitostanol (American Radiolabeled Chemicals) y 8 μCi

de [4- ^{14}C] colesterol (Nen Life Science Products), evaporando con gas nitrógeno y redisolviendo en etanol (80 μL) y aceite de oliva (800 μL).

Se administraron 100 μL de esta solución por alimentación forzada a ratones mantenidos en jaulas metabólicas individuales y se mantuvieron durante 72 h. Las heces durante este tiempo fueron recogidas, se les realizó una extracción lipídica, como se describe a continuación y posteriormente se contó la marca de [^3H] y [^{14}C]. El cálculo de porcentaje de absorción se realizó con la siguiente fórmula [165]:

$$100 \times [({}^{14}\text{C}/{}^3\text{H}) \text{ dosis de carga} - ({}^{14}\text{C}/{}^3\text{H}) \text{ heces}] / ({}^{14}\text{C}/{}^3\text{H}) \text{ dosis de carga}$$

Extracción de lípidos

La extracción lipídica [41,149] de las dietas, tejidos y heces se realizó con 1 g de muestra y 10 mL de isopropanol-hexano (3:2, v/v), en un agitador orbital durante 24 h. Se filtró el disolvente orgánico de la muestra sólida y para separar fases se añadieron 3 mL de Na_2SO_4 0,47 M, agitando durante 15 minutos en agitación orbital y centrifugando a 1000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica superior que contenía hexano y los lípidos se transfiere a un nuevo tubo donde será evaporado bajo flujo de gas nitrógeno. Una vez evaporado el hexano el extracto se resuspendió con 0,5% de colato sódico con 10 minutos de sonicación para emulsionar los lípidos y realizar determinaciones de colesterol y triglicéridos como se describe en el apartado de medida de parámetros lipídicos.

Extracción de ácidos biliares

La dieta aterogénica tiene una gran cantidad de colesterol, grasas saturadas y además colato sódico para inducir un perfil proaterogénico en los ratones, que de otro modo costaría mucho de conseguir. Es patente que el colato sódico no es un componente de las dietas estándar, sólo se encuentra en este tipo de dieta aterogénica. Para la extracción de ácidos biliares de heces o la dieta, se añadieron 2 mL de etanol a 1 g de muestra seca y se mantuvo en agitación orbital 24 h.

Posteriormente en la solución de etanol se midieron los ácidos biliares a través del método enzimático-colorimétrico que se describe a continuación.

Medida de ácidos biliares

Se utilizó el método de la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 α -HSD) (Sigma). La reacción se inicia con 100 μ L de la muestra diluida (1/10 extracto de heces) con 250 μ L de reactivo de ácidos biliares (NAD⁺ 2 mM, NBT 0.5 mM, diaforasa 500 U/L, tampón pH 7.0 y 3 α -HSD 1000 U/L) o bien blancos de reactivo de cada muestra con 100 μ L de muestra y 250 μ L de reactivo de blanco (con la misma composición que el reactivo del test excepto que no tiene 3 α -HSD). Estos tubos se incubaron a 37°C durante 5 minutos y la reacción se paró con 50 μ L de reactivo de stop (H₂SO₄ 2 N). Una vez parada la reacción se filtró mediante filtros de 0.45 μ m para eliminar materia particulada, se pasaron 200 μ L una microplaca y se midió la absorbancia a 530 nm en un lector de placas ELISA (AD/LD 340, Beckman Coulter). El cálculo se realizó restando la absorbancia las muestras con blanco de reactivo a la absorbancia de cada muestra incubada con reactivo de ácidos biliares y los valores se interpolaron en una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de ácidos biliares.

10. Medida del transporte reverso de colesterol específico de macrófagos

Acetilación de las LDL

Las LDL [³H] se acetilaron para facilitar su captación por los macrófagos, ya que éstos, al presentar receptores scavenger, tienen la capacidad de captar lipoproteínas modificadas. La acetilación se realizó partiendo 12 mL de LDL a una concentración de 4 g apoB/L y se añadió el mismo volumen de una solución de acetato sódico saturado. A continuación se añadieron 2 μ L de anhídrido acético, agitando suavemente a 4°C durante 15 minutos y se repitió esta operación 3 veces, hasta completar una incubación total de 1 hora. Finalmente las LDL se dializaron

extensivamente en saco con PBS y se equilibraron en medio RPMI 1640 deficiente (RPMI con 10% de LPD (suero deficiente en lipoproteínas) en lugar de suero bovino fetal) mediante gelfiltración, usando columnas PD-10 (Pharmacia).

Cultivos celulares y marcaje con [³H] colesterol

Se cargaron macrófagos bien con colesterol no esterificado y LDL acetiladas, como está descrito [166], o bien con LDL acetiladas marcadas previamente con colesterol esterificado. En los dos tipos de experimentos se utilizaron macrófagos de la línea P388D1 (*American Type Culture Collection, ATCC*), que son una línea celular con características adherentes, proveniente de neoplasma linfoide inducido en ratones DBA/2. Fueron cultivados en placas de cultivo de 75 cm con 5 millones de células por placa y crecidos en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, renovando el medio cada 48 h hasta conseguir un 90% de confluencia (6-7 días).

Para cargar los macrófagos con [³H] colesterol no esterificado, se incubaron con LDL acetilada (LDL a 100 µg apoB /mL) conjuntamente con [³H] colesterol (Amersham) con una actividad de 5 µCi/mL en RPMI deficiente, para evitar la presencia de otras lipoproteínas que no fueran la LDL acetilada. Una vez acabada la incubación se lavaron las células con PBS, se separaron del soporte sólido de la placa con un raspador de células, se pasó la suspensión de macrófagos a un tubo de centrifuga y se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 rpm para sedimentar las células. Después de descartar el sobrenadante se resuspendieron las células en PBS 0,2% de albúmina sérica bovina y se volvió a centrifugar 12 minutos a 1200 rpm y finalmente se resuspendió en PBS para realizar conteo de células, radiactividad y preparar las células para la inyección a los ratones.

Para marcar LDL con colesterol esterificado se prepararon liposomas con 250 µCi de oleato de [³H] colesterol (Amersham), 24 mg de lecitina y 80 µL de BHT 1 mM, se evaporó con gas nitrógeno y se resuspendió en 8 mL de tampón A (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) sonicando durante 10 minutos. Esta

emulsión se mezcló con LDL (60 mg de apoB en tampón A) obtenida por ultracentrifugación y con LPD dializado en tampón A (30 mL, a 100 g proteína/L obtenido de ultracentrifugación de plasma humano) como fuente de actividad CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol), durante 24 h a 37°C para conseguir la transferencia de colesterol marcado de los liposomas a las LDL [167]. Las LDL se reaislaron por ultracentrifugación secuencial, primero separando los liposomas a densidad 1,019 g/mL y posteriormente haciendo flotar las LDL a densidad 1,063 g/mL, como se describe en el apartado de aislamiento de lipoproteínas. Estas LDL [³H] marcadas con ésteres de colesterol se acetilaron como se describe en el apartado correspondiente (actividad específica 9x10⁶ desintegraciones por minuto (dpm) por mg de apoB), se incubaron durante 48 h con los macrófagos a una concentración de 100 µg apoB/mL en medio RPMI 1640 deficiente. Los lavados y la resuspensión para la inyección se realizaron como se describe para macrófagos marcados con colesterol libre.

Medida del transporte reverso de colesterol específico de macrófagos.

La medida del transporte reverso de colesterol específico de macrófagos a hígado y su eliminación por las heces se llevó a cabo inyectando macrófagos cargados con [³H] colesterol y midiendo su transferencia hígado y a heces, pasadas 48 h. En el caso de los macrófagos marcados con colesterol libre, se realizó inyectando intraperitonealmente 0,5 mL de PBS por animal, conteniendo 1,7x10⁶ células y 3,0x10⁶ dpm. En el caso de los macrófagos marcados con oleato de colesterol incorporado en LDL, se inyectaron 0,5 mL de PBS conteniendo 13x10⁶ de células y 3x10⁵ dpm. Los animales se mantuvieron individualmente en jaulas metabólicas y se recogieron las heces durante 48 h.

Se obtuvieron muestras de sangre a las 24 y 48 h de la inyección de macrófagos determinando el [³H] colesterol en plasma, en HDL mediante precipitación con fosfotúngstico-Mg (Roche Diagnostics) y en las lipoproteínas con apoB (no-HDL), contando el precipitado. A las 48 h se procedió al sacrificio, extracción de sangre, órganos y recogida de heces.

Se realizó una extracción lipídica de las muestras de hígado y heces como se describe en el apartado de extracción lipídica y se contó el [^3H] colesterol del extracto, analizando por TLC la proporción de colesterol libre/esterificado en condiciones análogas a las descritas en la determinación de actividad LCAT.

Para determinar la radiactividad de ácidos biliares en heces se contó la fracción no orgánica de la extracción lipídica y al extracto seco de las heces se le realizó una segunda extracción con etanol (2 mL) durante 18 horas para la extracción de ácidos biliares. La suma de la radiactividad de estas dos extracciones mostró recuperar aproximadamente el 85% de los ácidos biliares de heces en ensayos previos.

11. Análisis estadístico

El análisis de los resultados experimentales se realiza a través del test t de Student si se comparan dos grupos, one way-ANOVA si se comparan más de dos grupos con distribución normal. Los tests no paramétricos U de Mann-Witney o el test Kruskal-Wallis para comparar dos o más grupos respectivamente, se realizan en el caso de que la muestra no se ajuste una distribución normal (test Kolmogorov-Smirnoff) o el tamaño de la muestra sea pequeño. Los tests y gráficos se realizan con el paquete estadístico Prisma (GraphPad Prism versión 4.00 para Windows) y Microsoft Excel.

Resultados

Resultados, capítulo 1:

Protección de las HDL frente a la oxidación

1. Lípidos plasmáticos

Como está descrito en estudios previos en nuestro laboratorio, los ratones transgénicos de la línea 11.1 [33,40,168], después de tres meses de dieta aterogénica, rica en colesterol y con colato sódico, presentaron concentraciones de apoA-II humana de 123 ± 17 mg/dL, disminución de colesterol de HDL, con un aumento de las partículas de HDL de tamaño más pequeño y un aumento de triglicéridos y colesterol en lipoproteínas con apoB, como se muestra en los resultados de precipitación de HDL (Tabla R-1) y el perfil FPLC (Figura R-1). Los ratones 25.3, con un nivel de apoA-II humana en plasma de 18 ± 5 mg/dL, en cambio presentaron un perfil lipídico y lipoproteico similar a los ratones control

Tabla R- 1. Parámetros lipídicos de no-HDL y HDL del plasma de ratones

Animales control, transgénicos 25.3 y transgénicos 11.1 fueron alimentados con una dieta aterogénica durante 3 meses. Las lipoproteínas con apoB se precipitaron con fosfotúngstico. Se midieron los parámetros lipídicos de las HDL del sobrenadante y los parámetros no-HDL se calcularon restando los parámetros HDL del total. Los símbolos (*) y (**) expresan diferencia significativa respecto a los ratones control ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente).

(N = 12)	Control	25.3	11.1
Colesterol no-HDL	$4,1 \pm 0,7$	$5,35 \pm 0,18$	$9,6 \pm 1,1(**)$
Triglicéridos no-HDL	$0,50 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,06$	$1,99 \pm 0,44 (**)$
Fosfolípidos no-HDL	$1,42 \pm 0,43$	$1,37 \pm 0,09$	$2,75 \pm 0,58$
Colesterol HDL	$1,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,07 (*)$
Triglicéridos HDL	$0,037 \pm 0,007$	$0,041 \pm 0,040$	$0,026 \pm 0,008$
Fosfolípidos HDL	$1,31 \pm 0,17$	$1,58 \pm 0,11$	$1,19 \pm 0,18$

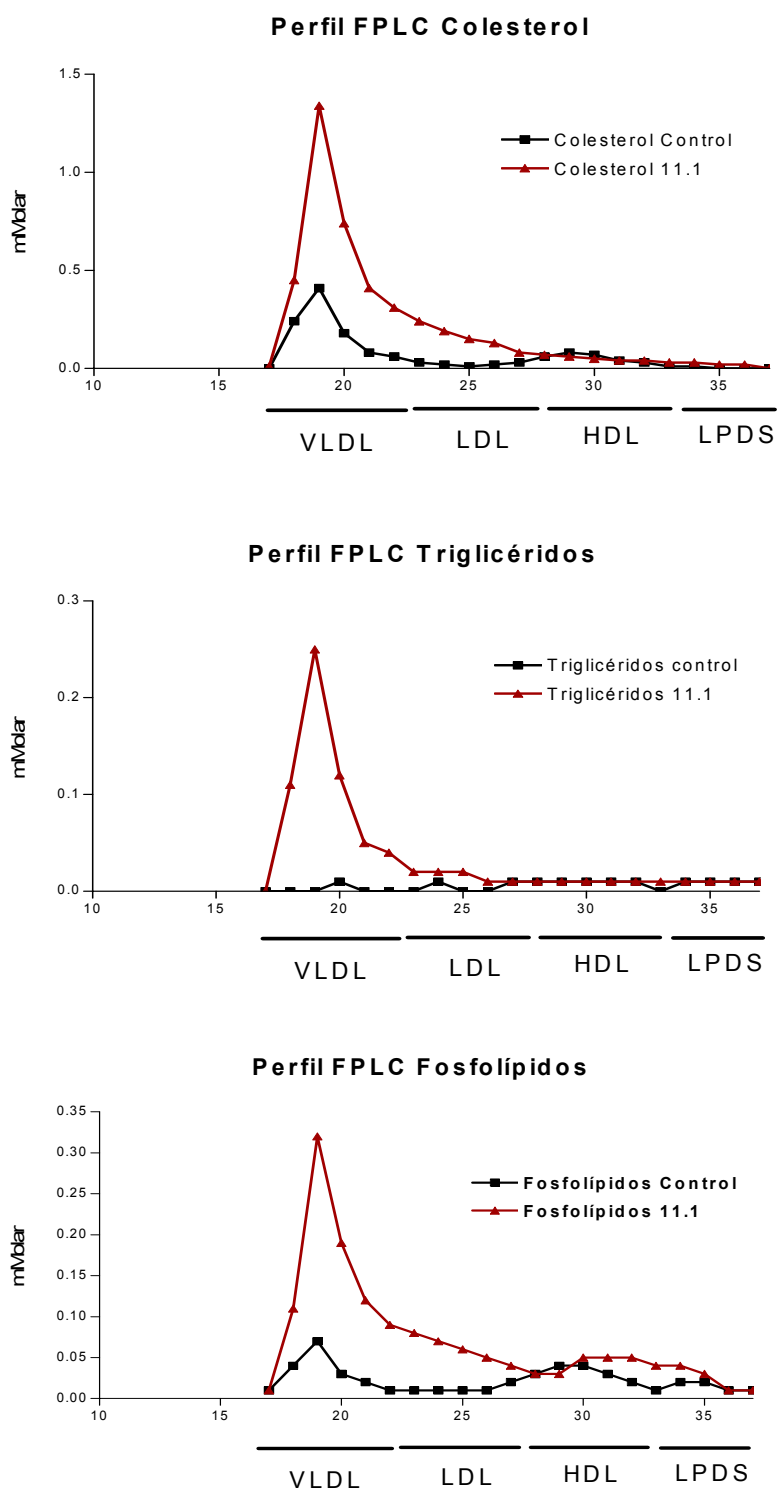


Figura R-1. Perfiles FPLC representativos de colesterol , triglicéridos y fosfolípidos de plasma.

Se sometieron a cromatografía 200 μ L de plasma de 8 animales de cada línea (control y 11.1), y se recogieron fracciones de 0,5 mL, con un flujo de 0,5 mL/min en PBS.

2. Análisis inmunohistoquímico y morfométrico de las lesiones aórticas

La cuantificación de la arteriosclerosis y de los análisis inmunohistoquímicos con anticuerpos contra epítomos de LDL oxidada se muestran en la Tabla 2. Además se muestra fotografías representativas de tinción de secciones de ratones 11.1 en la Figura R-2.

Tabla R-2. Áreas de tinción positiva para lesiones arterioscleróticas e inmunohistoquímica.

La determinación se realizó como se describe en Material y Métodos. El símbolo (***) indica diferencia significativa ($p < 0,001$) en un test ANOVA.

	Control (n = 12)	25.3 (n = 11)	11.1 (n = 10)
Área de lesión con ORO	6,8 ± 2,9	10,2 ± 3,1	83,1 ± 13,3 (***)
Área teñida MDA-2	2,5 ± 0,8	3,7 ± 1,3	43,6 ± 7,2 (***)
Área teñida NA-59	2,1 ± 0,7	3,4 ± 1,0	34,9 ± 4,8 (***)

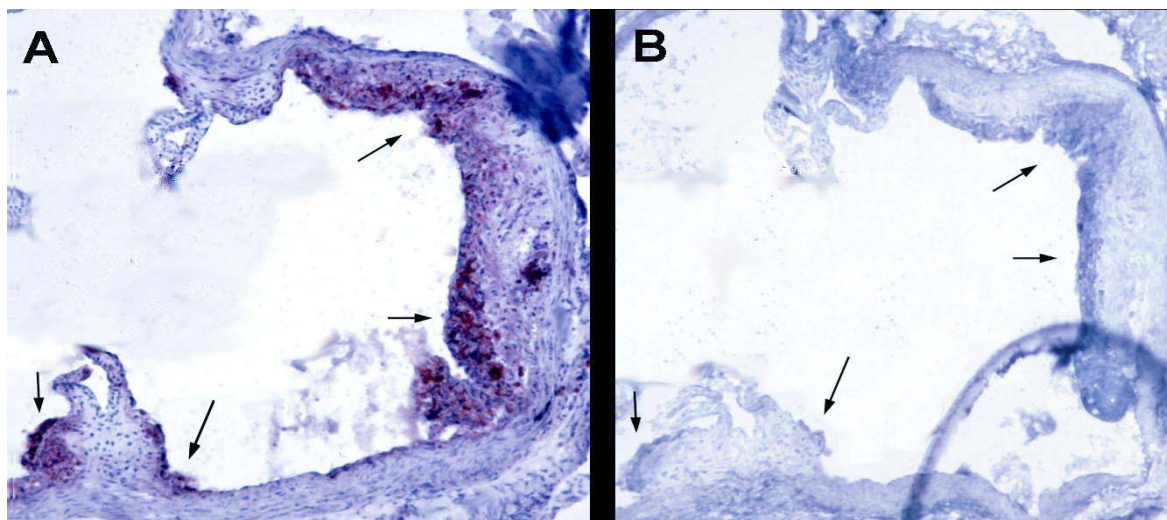


Figura R- 2. Secciones representativas de tinción con Oil Red O (ORO) y MDA-2 en aortas de ratones 11.1.

La Figura A presenta un detalle de una sección aórtica de ratón 11.1, teñida con ORO y hematoxilina-eosina. La Figura B presenta una sección sucesiva de la Figura A teñida con MDA-2. Se puede observar el engrosamiento de la capa íntima y las flechas indican las áreas de lesión más teñidas con ORO y MDA 2 en los engrosamientos de la íntima y cerca de las válvulas aórticas.

Después de 5 meses en dieta aterogénica los ratones control y 25.3 presentaron lesiones de tipo estría grasa, sobre todo cerca de las válvulas aórticas, y estas lesiones presentaron tinción específica para epítomos de LDL oxidada. Los ratones transgénicos 11.1 en cambio presentaron alrededor de 12 veces más área de lesión que los ratones control. Además estas lesiones fueron complejas, con regiones fibroproliferativas cerca de la pared de la aorta y regiones con acumulación de lípidos más teñidas con el colorante específico de lípidos Oil Red O, hacia el lumen del vaso. El área de epítomos oxidados, reconocidos por los anticuerpos MDA2 y NA-59, se encontró también drásticamente aumentado, hasta más de 17 veces, comparado con los ratones control y 25.3. En estas lesiones los epítomos oxidados se encuentran en gran parte en la zona grasa de la lesión.

3. Marcadores de estrés oxidativo en plasma y antioxidantes lipofílicos.

El 8-isoprostano es un eicosanoide producido por la oxidación no enzimática del ácido graso araquidónico, generalmente formando parte de los fosfolípidos, que está aumentado en casos de estrés oxidativo [169]. La determinación de 8-isoprostano en plasma de ratones de las diferentes líneas no mostró diferencia entre las tres líneas de ratones, como se muestra en la Tabla R-3. Las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico son derivados de la peroxidación lipídica, especialmente el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal [159], siendo por tanto indicativos de oxidación. En la determinación de TBARS en plasma de las diferentes líneas tampoco se encontraron diferencias.

Las vitaminas antioxidantes pueden retrasar la oxidación de las lipoproteínas [170], por lo que se midieron las vitaminas antioxidantes en lipoproteínas. No se detectaron niveles apreciables de carotenoides (α y β carotenos y licopeno), sólo se detectó α -tocoferol, y aunque la muestra es pequeña ($n=3$), no parece haber diferencias en tocoferol de HDL ni en lipoproteínas no-HDL (lipoproteínas con

apoB) (Tabla R-3). En conjunto estos datos indican que en el plasma de 11.1 no existe un mayor estrés oxidativo que en el plasma de los ratones control.

Tabla R- 3. Marcadores de oxidación plasmática y vitaminas antioxidantes lipofílicas.

Las determinaciones se realizaron como se describe en Material y Métodos, bien en plasma o bien en lipoproteínas aisladas por ultracentrifugación (no HDL, densidad menor que 1,063; HDL densidad de 1,063 a 1,210 g/mL). Los resultados se muestran como media \pm SEM, el número de individuos está indicado en la primera columna. Los grupos fueron comparados con un ANOVA no paramétrico (Kruskall-Wallis).

	Control	25.3	11.1
8- Isoprostano total plasma (pg/mL) (n=7)	166,0 \pm 34,1	170,1 \pm 34,0	175,6 \pm 20,4
TBARS (eq MDA/mL) (n=8)	2,3 \pm 0,2	2,1 \pm 0,5	2,0 \pm 0,4
α -tocoferol en No-HDL (mmol/mol lípidos) (n=3)	1,5 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	1,5 \pm 0,5
α -tocoferol en HDL (mmol/mol lípidos) (n=3)	5,2 \pm 0,2	4,4 \pm 0,3	4,7 \pm 0,1

4. Capacidad de las HDL de proteger a la LDL de la modificación oxidativa.

Se diseñaron una serie de aproximaciones experimentales con el objetivo de determinar si las HDL eran capaces de proteger a las lipoproteínas con apoB de la oxidación y si diferencias en esta capacidad son capaces de explicar el dramático aumento de productos de oxidación que se encuentran en el seno aórtico de los animales 11.1. Las lipoproteínas que sufren oxidación muestran un incremento de movilidad electroforética cuando son sometidas a electroforesis en geles de azarosa [171]. Esta propiedad puede ser utilizada para establecer el grado de oxidación de la LDL y ha sido utilizada con anterioridad para estudiar la capacidad protectora de las HDL [172,173]. Esta técnica tiene la ventaja adicional de que en la carrera electroforética se separan las diferentes lipoproteínas de una mezcla pudiendo medir la migración electroforética de la LDL sin necesidad de reislamiento por ultracentrifugación.

Se estudió la migración electroforética de VLDL y LDL de los ratones de las diferentes líneas coincubadas en condiciones oxidantes (presencia de 5,5 μM Cu_2SO_4) con HDL de la misma línea, como se muestra en la Figura R-3.

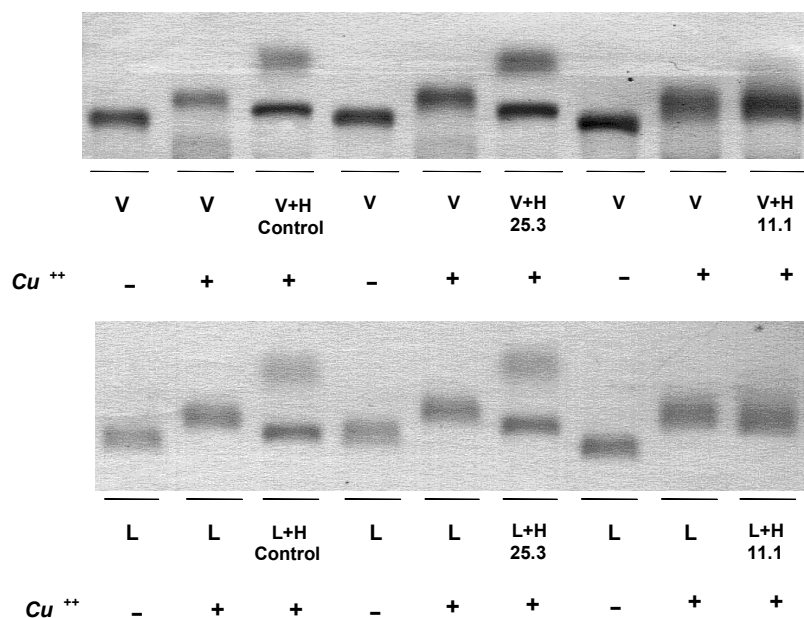


Figura R- 3. Protección de la HDL de la oxidación de la VLDL y LDL murina.

Los geles muestran tres series de tres carriles en los que VLDL (V en el panel superior) o LDL (L en el panel inferior) de la misma línea de ratones fueron incubados solas (primer carril de cada serie, lipoproteína nativa), en presencia de cobre (segundo carril, lipoproteína oxidada) o bien con cobre y HDL de las diferentes líneas (tercer carril de cada serie). Se muestra un experimento representativo.

Cuando las lipoproteínas con apoB se oxidan incrementan su movilidad electroforética, como se observa cuando se compara la lipoproteína incubada sin cobre (sin condiciones oxidantes) con la que ha estado incubada con cobre. Este cambio de movilidad electroforética es inhibido en las incubaciones en las que se ha añadido HDL de ratón control o 25.3. Sin embargo la HDL de los ratones 11.1 no es capaz de evitar la oxidación y el cambio de movilidad electroforética ni de las VLDL ni de las LDL.

Para evitar la posible interferencia de la diferente composición de las lipoproteínas de apoB de las diferentes líneas de ratones y, por tanto, de su susceptibilidad a la oxidación, se utilizó LDL humana para testar la capacidad protectora de las HDL de las diferentes líneas. De la LDL humana se tiene mayor disponibilidad y se conocen sus características con mucho mayor detalle que las lipoproteínas con apoB de ratón. En los anteriores ensayos se utilizaron los fosfolípidos de HDL como parámetro de estandarización para poner la misma cantidad de HDL de las diferentes líneas. Sin embargo, dadas las importantes diferencias en la composición de las HDL de las tres líneas de ratones, se repitió el ensayo igualando la cantidad de HDL añadida ajustando también por concentración de proteínas y colesterol. En todos los casos se obtuvo un resultado similar (Figura R-4A). En estos ensayos se puede observar que las HDL de los ratones 11.1 tienen una movilidad electroforética menor y una menor tinción por Negro Sudán, indicando una composición alterada. Nuevamente las HDL de ratones control y 25.3 fueron capaces de inhibir la oxidación en un grado mucho mayor que las HDL de 11.1, independientemente del parámetro elegido para estandarizar la cantidad de HDL añadida a la LDL.

Se realizaron una serie de experimentos utilizando LDL humana y HDL de aislamientos independientes, estudiando la movilidad electroforética de LDL humana incubada con HDL de las diferentes líneas (Figura R-4B). En algunas de estas incubaciones se midieron los hidróxidos del ácido linoleico (9-HODE y 13 HODE), como marcadores del grado de oxidación de las lipoproteínas. Los resultados se muestran en la Figura R-5.

En todos los casos la HDL de ratones control y 25.3 fueron capaces de proteger del incremento de movilidad electroforética de las LDL humanas, pero no ocurrió con las HDL de 11.1 (Figura R-4B). La medida de hidróxidos derivados del linoleico en estas incubaciones mostró que hay una mayor acumulación de 9-HODE y 13-HODE en las incubaciones de LDL que fueron oxidadas en presencia de HDL de 11.1, mostrando por tanto un mayor grado de oxidación (Figura R-5).

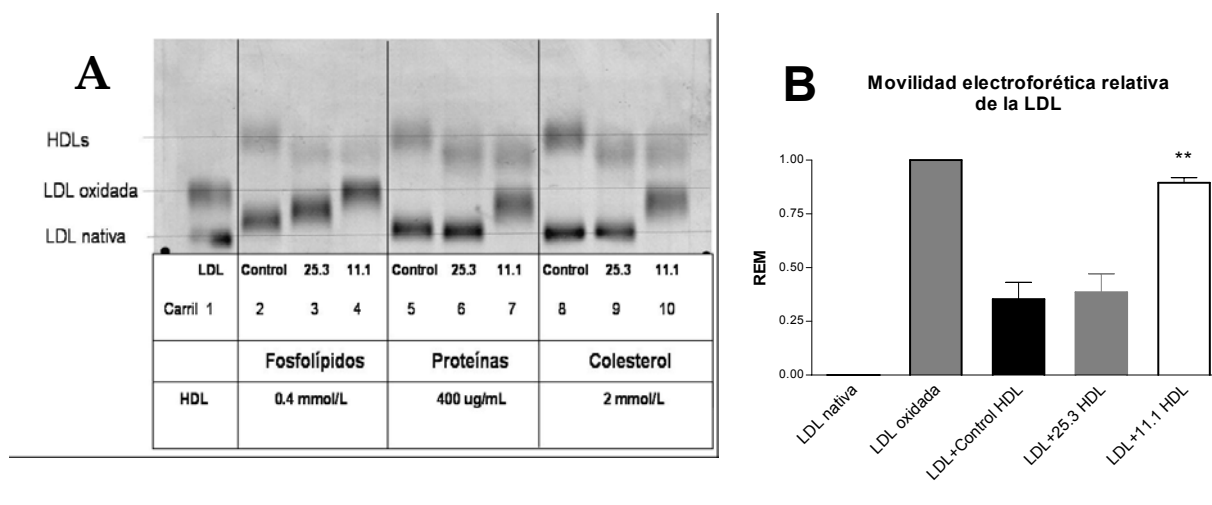


Figura R- 4. Protección de la oxidación de LDL humana por parte de las HDL (movilidad electroforética relativa).

Gráfico A: Se coincubaron LDL humana y HDL de ratones control y transgénicos, igualando por cantidad de fosfolípidos, proteína o colesterol de HDL. La LDL nativa y oxidada se cargaron juntas en el carril 1.

Gráfico B: Gráfico de barras de 7 experimentos independientes de oxidación de LDL humana en presencia de HDL de las diferentes líneas. Los ensayos y la determinación de movilidad electroforética se realizó como se describe en Material y Métodos. (**) indica diferencia significativa ($p < 0.01$).

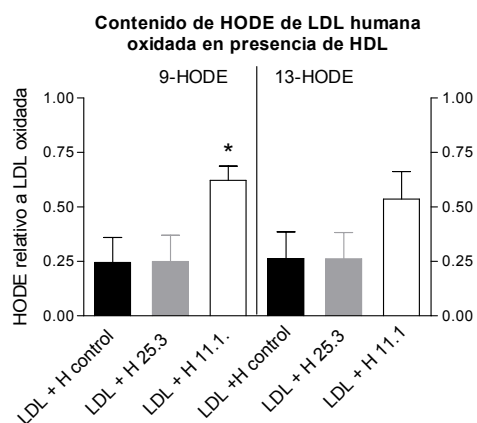


Figura R-5. Contenido de HODEs de las LDL humanas oxidadas en presencia de HDL de las diferentes líneas.

Contenido de HODEs de las LDL incubadas con HDL en las mismas condiciones que para la medida de movilidad electroforética. (*) indica diferencias significativas respecto a control ($p < 0,05$) en un ANOVA no paramétrico (Kruskall-Wallis) con $n=3$.

La movilidad electroforética podría aumentar por motivos independientes de la oxidación, como cambios de composición o modificaciones enzimáticas de las LDL. Por ello, además de la medida de HODEs y la migración electroforética, se llevaron a cabo aproximaciones experimentales diferentes con la misma estrategia de combinar LDL humana y HDL de las diferentes líneas, como son la determinación de la fase de latencia de la cinética de oxidación y la fluorescencia de diclorofluoresceína (DCF).

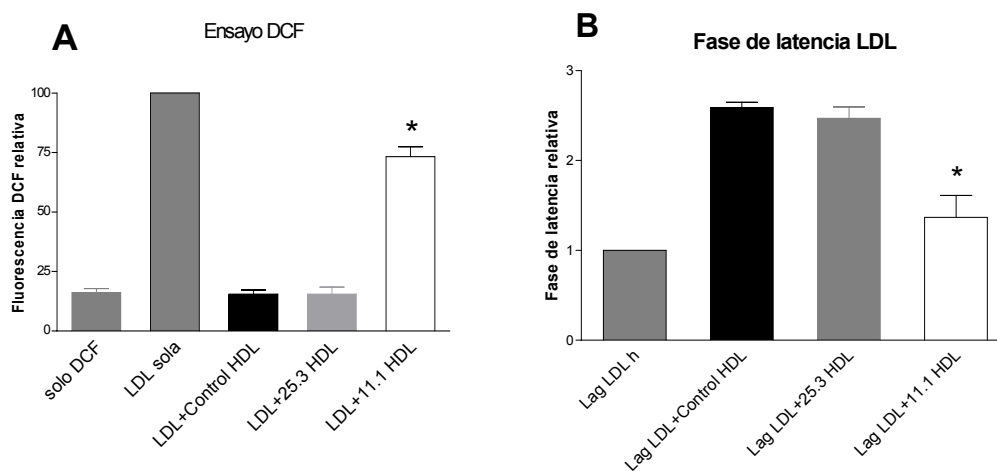


Figura R- 6. Ensayos de protección de la oxidación de las LDL humanas por parte de las HDL: fluorescencia de DCF y fase de latencia de cinética oxidación de LDL.

Se presentan ensayo de oxidación y medida de fluorescencia de DCF (gráfico A) y fase de latencia de la LDL en la cinética de oxidación de la LDL (gráfico B). Los ensayos se realizaron como se describe en Material y Métodos. Los símbolos (*) indican diferencias significativas respecto a control ($p < 0,05$) en un ANOVA no paramétrico (Kruskall-Wallis). El tamaño de la muestra es $n=5$ para el gráfico A y $n=4$ para el gráfico B.

El compuesto DCF emite fluorescencia al reaccionar con especies reactivas del oxígeno y por tanto midiendo la fluorescencia del DCF en una incubación de lipoproteínas se puede medir el grado de oxidación de éstas. Esta aproximación ha sido utilizada para detectar HDL incapaces de proteger de la oxidación en pacientes humanos [162]. En la [Figura R-6A](#) se observa que las LDL incubadas solas se oxidan y producen un aumento de fluorescencia del DCF, pero las HDL de control y 25.3 son capaces de evitar el aumento de fluorescencia al ser

coincubadas con la LDL humana, mientras que esta inhibición es mucho menor en las LDL incubadas con HDL de 11.1.

La oxidación de las lipoproteínas puede seguirse a través de la monitorización de los dienos conjugados que se forman en estas fases, provenientes de los ácidos grasos poliinsaturados, midiendo la absorbancia a 234 nm. La fase de latencia puede ser prolongada por antioxidantes, los cuales secuestran la reacción iniciadora o interfieren en las especies que propagan la reacción [174]. Por tanto, la fase de latencia en los procesos de peroxidación lipídica refleja el potencial antioxidante de las lipoproteínas. En la cinética de dienos conjugados, las HDL de control y 25.3 retrasaron marcadamente la oxidación de la LDL humana (160% y 146% respectivamente) mientras que la HDL de 11.1 retrasó sólo un 36% la cinética de oxidación, en comparación con la fase de latencia de la LDL incubada sola (Figura R-6B).

En resumen, a través de cuatro aproximaciones metodológicas (movilidad electroforética, medida de HODEs, fluorescencia de DCF y medida de fase de latencia) utilizadas se demuestra que las HDL de los ratones transgénicos 11.1 no son capaces de proteger de la oxidación a las lipoproteínas con apoB, como lo hacen las HDL de ratones control y transgénicos 25.3.

5. Análisis de la composición y propiedades de las HDL

A la vista de los resultados que muestran una pérdida de capacidad de protección frente a la oxidación de las HDL de transgénicos 11.1, se estudiaron las HDL de estos ratones en detalle comparándolas con las de sus controles, y prestando especial atención a los lípidos, apolipoproteínas y enzimas asociados a las partículas de HDL. Se determinaron en el plasma de las diferentes líneas de ratones las actividades enzimáticas que, según la bibliografía, están relacionadas con la protección antioxidante de la HDL y se muestran en la Tabla R-4.

Tabla R-4. Actividades plasmáticas de los enzimas asociados a HDL relacionados con la capacidad antioxidante de las HDL.

Las actividades se muestran en U/mL, tomando las unidades enzimáticas como se describen en Material y Métodos. Las actividades arilesterasa total y EDTA-sensible se midieron en un conjunto de plasmas diferente del utilizado para la actividad PMSF-resistente. (**) y (***) indican diferencia significativa respecto a control en ANOVA con $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente.

	Control	25.3	11.1
Arilesterasa (total) (n = 16)	32,6 ± 1,5	31,4 ± 1,6	24,7 ± 1,2 (**)
Arilesterasa (EDTA-sensible) (n = 16)	16,4 ± 1,0	15,6 ± 1,2	7,4 ± 0,9 (***)
Arilesterasa (PMSF-resistente) (n = 8)	14,8 ± 1,6	18,1 ± 2,0	5,5 ± 0,7 (**)
PAF-AH (n = 8)	103,9 ± 7,9	107,7 ± 6,7	74,4 ± 6,8 (**)
LCAT (n = 5)	7,2 ± 1,7	ND	4,4 ± 0,3
Glutación selenoperoxidasa (n = 10)	14,2 ± 0,9	13,0 ± 0,5	14,9 ± 0,6

La actividad arilesterasa plasmática total en los ratones transgénicos fue alrededor de un 75% de la actividad que presentaron los ratones control o los 25.3. Ya que la PON1 es un enzima calcio-dependiente, al añadir EDTA al tampón de reacción la actividad arilesterasa derivada debida a la PON1 se inhibe [111]. Sin embargo, al realizar esta determinación se comprobó que la actividad arilesterasa del plasma no era totalmente inhibida por el EDTA, y por tanto podía haber otro enzima con actividad arilesterasa en el plasma de ratón. Por otro lado esta actividad arilesterasa resistente al EDTA de otro(s) enzimas era inhibible por PMSF. No obstante, el PMSF no inhibió la actividad sensible a EDTA debida a la PON1. Por tanto se utilizó la actividad arilesterasa EDTA-sensible para medir la actividad de PON1 de las muestras estudiadas.

La actividad PON1 medida como arilesterasa EDTA-sensible o como PMSF resistente, se encontró reducida en el plasma de ratones transgénicos 11.1 de manera muy significativa (un 45% de la actividad de control).

La PAF-AH por su parte también se encontró disminuída significativamente, siendo un 75% de actividad en 11.1 respecto a los control.

La actividad LCAT, medida con un ensayo exógeno que mide la cantidad de este enzima, no mostró diferencias significativas, aunque si una cierta tendencia a estar reducida. Paralelamente, no se encontraron tampoco diferencias en la actividad de la glutatión selenoperoxidasa que mostró una actividad plasmática similar en el plasma de las tres líneas de ratones estudiadas.

Estudio de las HDL aisladas por ultracentrifugación.

Las HDL aisladas por ultracentrifugación fueron estudiadas midiendo parámetros lipídicos y las actividades específicas de los enzimas asociados a HDL que se han relacionado con su capacidad antioxidante. Los resultados de la composición relativa de lípidos y proteína se muestran en la Tabla R-5, y las actividades específicas de los enzimas asociados a HDL se muestran en la Tabla R-6.

Tabla R-5. Composición porcentual de lípidos y proteína de HDL, separadas por ultracentrifugación.

Los resultados se muestran como porcentaje de masa respecto al total. Se muestran los resultados de 11 determinaciones independientes. (**) y (*) indican diferencia significativa respecto a control con $p < 0,01$ o $p < 0,05$ respectivamente.

	%Colesterol	%Triglicéridos	%Fosfolípidos	%Proteína
Control	21,4 ± 1,0	0,7 ± 0,5	30,1 ± 2,1	47,8 ± 2,6
25.3	21,4 ± 0,9	1,1 ± 0,4	27,3 ± 2,9	50,2 ± 3,2
11.1	19,7 ± 1,7	0,8 ± 0,1	43,7 ± 3,5 (**)	34,7 ± 4,3 (*)

Las HDL de los ratones transgénicos 11.1 muestra una composición alterada, sobre todo respecto a los componentes de la superficie de la partícula. La proporción de fosfolípidos está aumentada respecto a la de los ratones control y 25.3 y en cambio la composición proteica está disminuída. El colesterol total aparentemente no presenta cambios, aunque según estudios anteriores [40] la

proporción de colesterol libre en HDL es mayor en los ratones transgénicos (56%) que en control (13%).

Tabla R-6. Actividades específicas de enzimas y antioxidantes asociados a HDL: arilesterasa, PAF-AH.

(*) indica diferencia significativa ($p < 0.05$) en un test ANOVA, respecto al ratón control.

	Control	25.3	11.1
Arilesterasa de HDL Unidades / mg proteína de HDL (n = 8)	6,9 ± 1,6	7,0 ± 1,0	2,6 ± 0,69 (*)
PAF-AH de HDL Unidades / mg proteína de HDL (n = 4)	2,7 ± 0,5	2,8 ± 0,4	0,8 ± 0,2 (*)

Las determinaciones de arilesterasa y PAF-AH se encontraron disminuidas en los ratones 11.1 respecto a las HDL de ratones control, mientras que los ratones 25.3 mostraron unas actividades específicas similares a los ratones control. No se detectó actividad arilesterasa EDTA-resistente en las HDL aisladas por ultracentrifugación, siendo por tanto, toda la actividad arilesterasa atribuible a la PON1. La mayor parte de la actividad PON1 se encontró asociada a HDL (entre un 78 y un 87%) y la restante se encontró en el LDP (*lipoprotein-depleted plasma*, fracción libre de lipoproteínas) en las tres líneas. Por el contrario la arilesterasa EDTA-resistente se encontró sólo en el LPD. Por otro lado, la PAF-AH, aunque se detectó y midió actividad en las HDL aisladas, se encontró que la actividad quedaba mayormente en el LPD (un 87-94%) en las tres líneas.

Adicionalmente se realizaron determinaciones de LCAT exógena y GPX3, pero no se encontraron estas actividades en las HDL aisladas por ultracentrifugación. Tampoco se detectaron actividades apreciables de estos enzimas en las demás fracciones lipoproteicas pero sí en el LPD.

Estudio del perfil de las HDL por cromatografía de gel filtración (FPLC)

El plasma heparinizado fue separado por cromatografía de gel filtración por FPLC y las fracciones correspondientes a HDL (fracciones de la 27 a la 32) y LPD (fracciones de la 32 a la 36) fueron analizadas en detalle en cuanto a su composición y actividades enzimáticas. Perfiles representativos de las cromatografías se muestran en la [Figura R-7](#) y [Figura R-8](#).

El perfil de la apoA-I de cada línea fue evaluado por *Western Blot* y cuantificación densitométrica de las bandas detectadas mediante un anticuerpo específico ([Figura R-7A](#)). En este perfil se observó que los ratones 11.1 tenían una marcada disminución de apoA-I en HDL. Además aparecieron dos poblaciones de HDL con apoA-I, una en el diámetro típico de las HDL y otra en HDL muy pequeñas o proteínas libres de lípidos. Las HDL de 25.3 no presentaron diferencias o incluso un ligero incremento de apoA-I en HDL.

La apoA-II humana en 11.1 se encontró en HDL pequeñas, coincidiendo con las fracciones donde menos apoA-I se encontró ([Figura R-7B](#)). En los ratones 25.3, la mayor parte de apoA-II humana se encuentra en partículas HDL grandes y hay menos apoA-II humana que en los ratones 11.1. El colesterol está disminuido en las HDL de los ratones 11.1, pero por otro lado los fosfolípidos sólo mostraron una ligera disminución en comparación con los ratones control ([Figura R-7 C y D](#)). Tanto el perfil del colesterol como el de fosfolípidos mostraron un desplazamiento, predominando las partículas de HDL más pequeñas que en los ratones control. La distribución de las apolipoproteínas y lípidos de las HDL de los ratones transgénicos es consistente con población principal de HDL que contiene sólo apoA-II humana, de pequeño diámetro y con un menor contenido de ésteres de colesterol que la HDL de control.

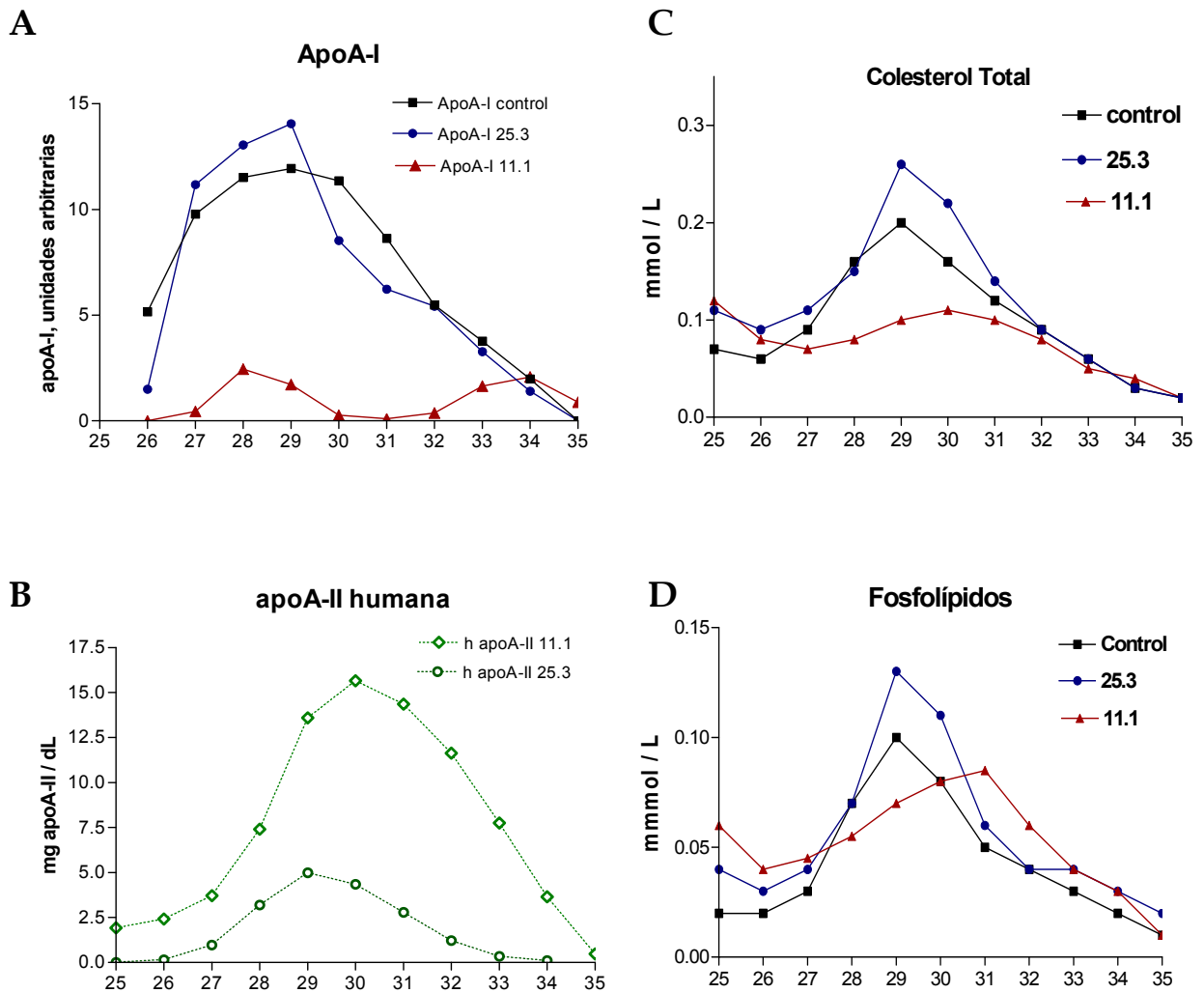


Figura R-7. Perfiles representativos de FPLC de las fracciones de HDL: apolipoproteínas y lípidos.

Fracciones correspondientes a HDL (de la 26 a la 31) y fracciones libres de lipoproteínas (LPD) (de la 32 en adelante) de 0,5 mL de plasma (heparina). Los perfiles muestran la determinación de apolipoproteínas (apoA-I murina por densitometría de *western blot*, apoA-II humana por inmunoturbidimetría en autoanalizador), colesterol total y fosfolípidos.

La actividad arilesterasa total mostró una disminución de actividad en las fracciones que corresponden a HDL en ratones transgénicos 11.1, pero no hay diferencias en el perfil de fracciones que corresponden a proteínas libres de lipoproteínas. (Figura R-8A). El perfil de actividad arilesterasa EDTA-sensible, que corresponde a PON1, mostró que las HDL de 11.1 tenían una actividad muy baja en comparación con control y 25.3, y además el pico de actividad arilesterasa que se encontraba en las fracciones libres de lipoproteínas era de actividad EDTA-resistente, no atribuible a PON1 (Figura R-8B).

Mediante *Western Blot* de PON1 en HDL aisladas por ultracentrifugación, se encontró que, de acuerdo con la actividad PON1 disminuida, también la cantidad del enzima asociado a HDL era menor (Figura R- 8C).

La actividad PAF-AH mostró una disminución marcada de actividad en las HDL de ratones 11.1 y se encontró sobre todo asociado a las fracciones de HDL (Figura R-8D). La actividad LCAT exógena, no fue diferente respecto a la de los ratones control (Figura R-8E). La glutatión selenoperoxidasa se encontró con un perfil similar en las tres líneas, aunque sólo se encontró en fracciones libres de lipoproteínas como se observa en la Figura R-8F.

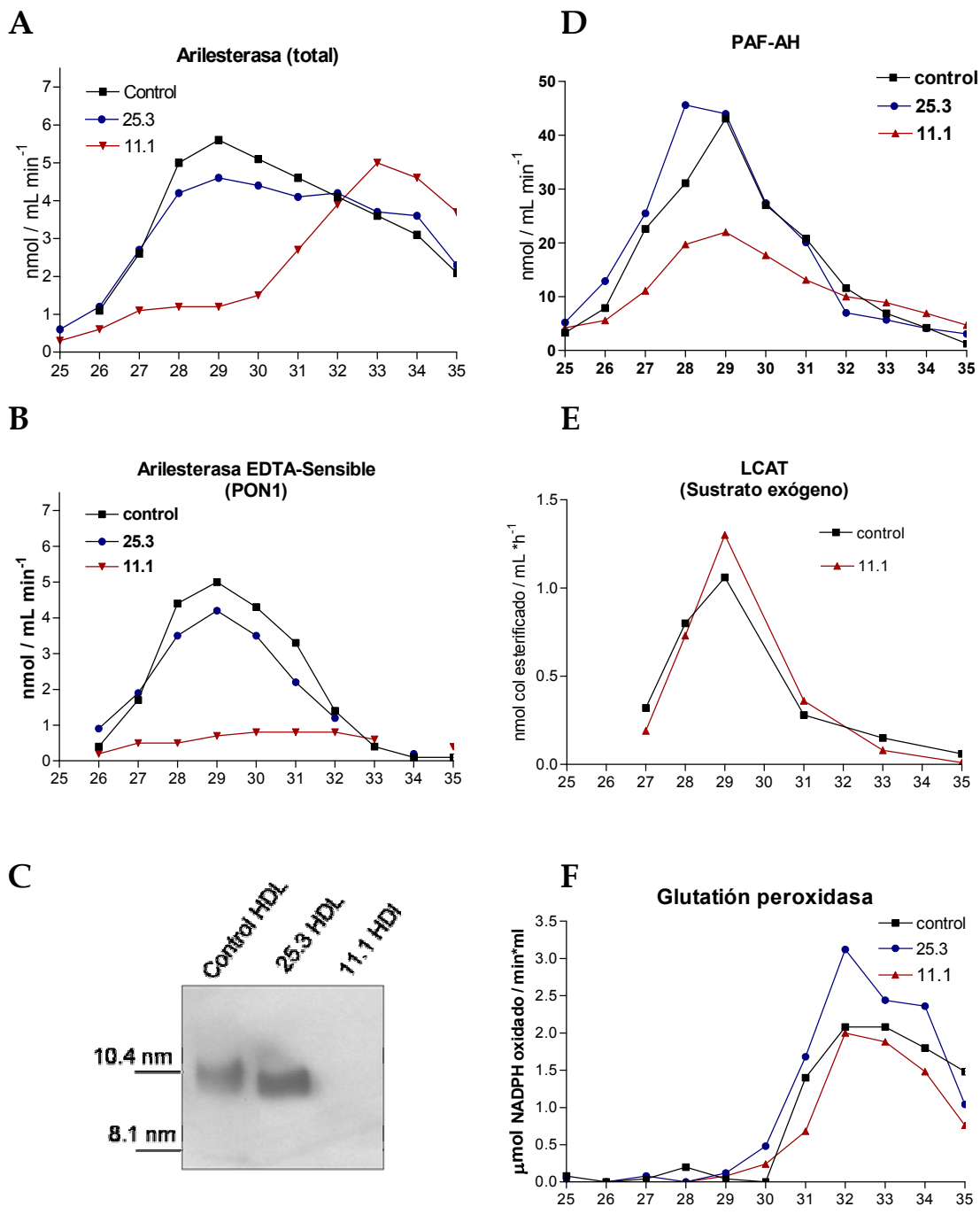


Figura R-8 Perfiles representativos de FPLC de las fracciones de HDL: Enzimas antioxidantes

Fraciones correspondientes a HDL (de la 26 a la 31) y fracciones libres de lipoproteínas (LPD) (de la 32 en adelante) de 0,5 mL de plasma (heparina). Los perfiles muestran la determinación las actividades, arilesterasa total (A); arilesterasa EDTA-sensible (PON1) (B); electroforesis nativa e inmunodetección de PON1 en HDL aislada por ultracentrifugación (6 μg de proteína de HDL) de las diferentes líneas de ratones, (C); PAF-AH (D); LCAT frente a sustrato exógeno (E) y glutatión selenoperoxidasa (F).

Determinación de RNA mensajeros hepáticos de enzimas y apolipoproteínas asociados a HDL

Para determinar si el origen de la disminución encontrada en ciertas apolipoproteínas y enzimas asociados a HDL tenía su origen en la transcripción de sus RNA mensajeros, se midió la expresión hepática de los genes de apoA-I, apoA-II, apoA-II humana (transgen), PON1, LCAT y PAF-AH a través de transcripción reversa y PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados se muestran en la Tabla R-7.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ninguno de estos transcritos una vez corregidos por un control interno (GAPDH). El transgén tiene un elevado nivel de transcripción pero esto no afecta a la transcripción de ninguno de los RNA mensajeros medidos.

Tabla R-7. Medida de la expresión génica de apolipoproteínas y enzimas asociados a HDL.

La abundancia de cada transcrito está expresada como ratio respecto a la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH); la determinación se realizó en hígado de ratones sometidos a dieta aterogénica durante tres meses, n = 5. No se encontraron diferencias con el test no paramétrico U de Mann-Witney.

	Control	Transgénicos 11.1
Apolipoproteína A-I	8,0 ± 1,5	7,1 ± 0,7
Apolipoproteína A-II (murina)	11,6 ± 2,0	14,2 ± 1,5
Apolipoproteína A-II (humana)	—	1083 ± 98
PON1	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,02
PAF-AH	0,015 ± 0,004	0,022 ± 0,004
LCAT	0,23 ± 0,02	0,33 ± 0,04

Estudio del desplazamiento *in vitro* de la PON1 por apoA-II humana pura.

La expresión de apoA-II humana provoca cambios en las propiedades de la HDL de ratones 11.1, y por ello se buscó reproducir *in vitro* la asociación de esta proteína en HDL. Está descrito que la apoA-II humana es capaz de desplazar la apoA-I de la HDL [168], por lo que se diseñaron experimentos para determinar si también es capaz de desplazar los enzimas de la partícula de HDL. Se estudió la capacidad de la apoA-II humana de influir sobre la HDL y su composición a través de ensayos *in vitro* en los cuales se añadía esta apolipoproteína a plasma o HDL de ratones control.

Las incubaciones de plasma de ratones control con apoA-II humana pura mostraron una disminución en la actividad PON1 del plasma de manera dosis-dependiente (Figura R-8A), de manera que a concentraciones similares a las que se encuentran en ratones transgénicos 11.1 (120 mg/dL) la actividad PON1 disminuyó un 50% cuando el plasma fue incubado a 37°C. Sin embargo, en las incubaciones llevadas a cabo a 4°C no se encontró esta disminución de actividad. Tampoco se encontraron variaciones de actividad PAF-AH (91,5 nmol/mL min en el plasma incubado sin apoA-II humana y 92.5 nmol/mL min en plasma incubado con 120 mg/mL de apoA-II, a 37°C) ni en la actividad arilesterasa EDTA-resistente. La cromatografía por FPLC de plasma de control incubado solo, o con 120 mg/dL de apoA-II humana (Figura R-8B) mostró que en las fracciones de FPLC correspondientes a HDL la actividad PON1 disminuía a la mitad y que la apoA-II humana añadida se había asociado a la HDL (fracciones 27-32).

En HDL de ratón control aislada e incubada con apoA-II humana la actividad de las HDL incubadas a 37°C disminuyó hasta ser casi nula desde las primeras concentraciones de apoA-II humana estudiadas (Figura R-8C), mientras que este efecto no ocurrió en HDL incubadas a 4°C, donde la actividad se mantuvo invariable.

La inmunodetección de PON1 en HDL reveló que las HDL incubadas a 4°C tenían un diámetro particular aparente mayor que la HDL incubada sola, mientras que las HDL incubadas con apoA-II a 37°C la banda correspondiente a PON1 desaparecía de la zona de la HDL (Figura R-8D).

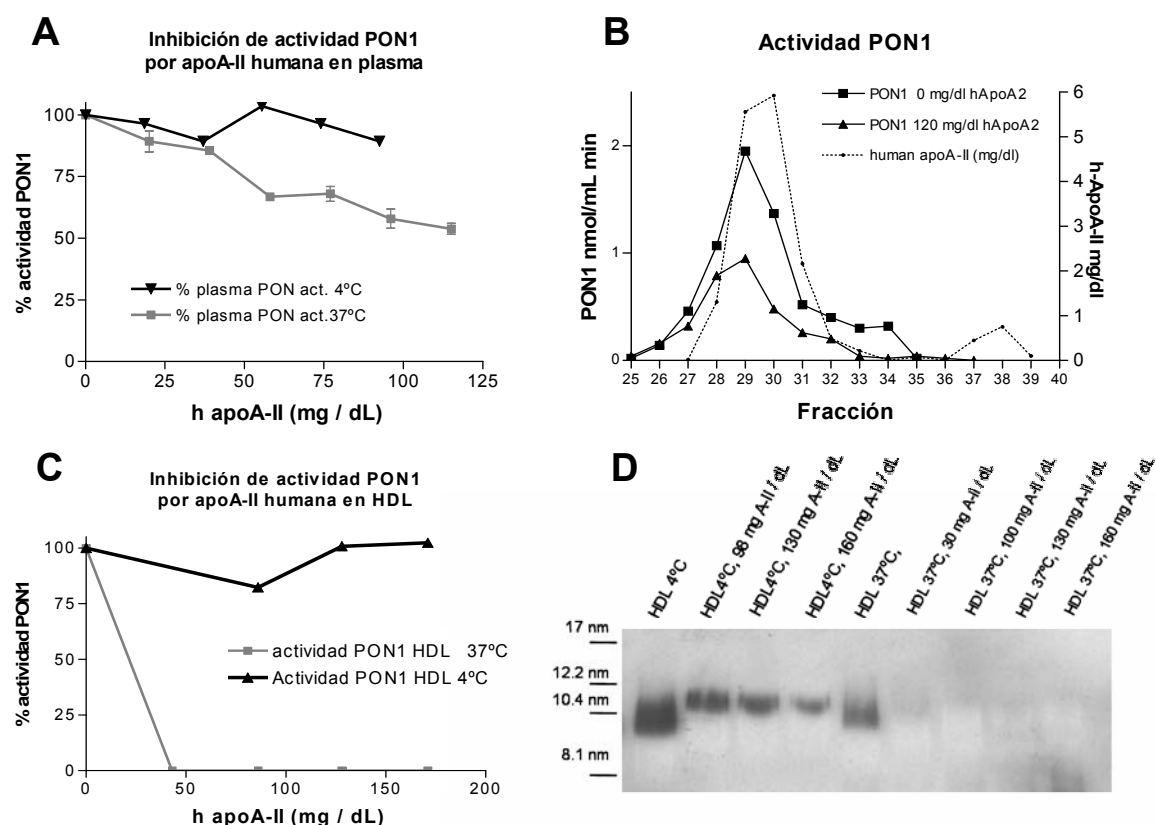


Figura R-9. Efecto del enriquecimiento de las HDL con apoA-II humana.

Gráfico A: inhibición de la actividad PON1 en plasma heparina de ratón control al añadir concentraciones crecientes de apoA-II humana, incubado a 37°C o a 4°C durante 3 h; el porcentaje está referido a la actividad de la muestra incubada sin apoA-II humana.

Gráfico B: fracciones correspondientes a HDL de una cromatografía FPLC de plasma incubado con 120 mg/dL de apoA-II humana en las mismas condiciones que el gráfico anterior.

Gráfico C: Actividad relativa PON1 de HDL de ratones control (1mM de fosfolípidos), incubadas en las mismas condiciones que en el gráfico A.

Gráfico D: Electroforesis nativa e inmunodetección de PON1 de HDL de ratón control incubada con concentraciones crecientes de apoA-II a 4°C o a 37°C.

La oxidación lipídica es capaz de inhibir la PON1, como sugieren algunos estudios [175,176]. La naturaleza hidrofóbica de la apoA-II humana puede dar lugar a que en el proceso de purificación de la apoA-II, ésta llevara consigo fosfolípidos asociados. Para comprobar si lípidos oxidados que podría contener la apoA-II humana pudieran ser los responsables de disminución de la actividad PON1 observada se realizó una extracción lipídica de la solución de apoA-II humana pura y se añadió a HDL de ratón control, incubando en las mismas condiciones que las indicadas más arriba. No se observó inhibición de la actividad PON1 en la HDL incubada con este extracto.

Resultados capítulo 2:

Transporte reverso de colesterol de HDL

1. Determinación de parámetros fecales y absorción de colesterol.

El paso final del transporte reverso de colesterol es la llegada del colesterol al hígado, su paso a ácidos biliares y su excreción a la bilis, bien como ácidos biliares o como colesterol. Estos compuestos pasan al intestino donde tienen la función de emulsionar los lípidos de la dieta, siendo en parte reabsorbidos posteriormente, volviendo a pasar a la circulación enterohepática.

Para descartar que una diferencia de absorción o de excreción biliar de colesterol y ácidos biliares pudiera ser la causa de las diferencias encontradas en colesterol plasmático, se estudió la absorción de colesterol y excreción de ácidos biliares. Se realizó una extracción lipídica y una extracción de ácidos biliares de la dieta y a partir de estos datos de ingesta y composición se calculó la entrada de colesterol y ácidos biliares. Paralelamente se estudió la cantidad y composición de las heces para calcular la salida.

La absorción intestinal de colesterol se mide como el cambio en la proporción de colesterol/sitostanol administrado oralmente respecto del eliminado por las heces. El sitostanol es una molécula con estructura y propiedades similares al colesterol pero que prácticamente no es absorbida en el intestino. Los resultados del balance de entrada y salida de colesterol y ácidos biliares a través del tracto gastrointestinal y la absorción de colesterol se muestran en la Tabla R-8.

Tabla R-8. Balance de colesterol, lípidos, sales biliares a través del tracto gastrointestinal.

Los animales control y transgénicos 11.1, mantenidos en dieta aterogénica durante tres meses se separaron en jaulas individuales y su ingesta y producción de heces fue monitorizada durante 48 h. Para la medida de la absorción intestinal de colesterol se administró colesterol [^{14}C] y sitostanol [^3H] por vía oral y se determinó la proporción de [^{14}C]/ [^3H] en heces a las 72 h. Los resultados se expresan por animal y día.

	Control	Transgénicos 11.1
Número de animales	(9)	(8)
Ingesta dieta (g/día)	4,1 ± 0,1	4,3 ± 0,3
Entrada de colesterol dieta (µmol/día)	94,2 ± 3,2	98,3 ± 6,1
Colesterol fecal (µmol/día)	51,9 ± 6,4	58,4 ± 3,8
Entrada triglicéridos dieta (µmol/día)	202,7 ± 6,9	211,6 ± 13,2
Salida fecal de triglicéridos (µmol/día)	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Absorción de triglicéridos %	99,6 ± 0,03	99,5 ± 0,04
Entrada de ácidos biliares dieta (µmol/día)	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2
Salida de ácidos biliares fecales (µmol/día)	3,6 ± 0,2	3,6 ± 0,1
Absorción intestinal de colesterol (%) (n=3)	87,5 ± 1,0	88,4 ± 1,0

La ingesta de los ratones control y los transgénicos 11.1 fue muy similar, por lo que los valores de entrada de colesterol, lípidos y ácidos biliares también son similares. La absorción de triglicéridos es muy eficiente, cercana 100%, y no hay diferencias entre los ratones control y los transgénicos 11.1. Tampoco hay diferencia en la excreción de ácidos biliares por las heces. El balance de ácidos biliares indica que se pierden más ácidos biliares de los que entran por la dieta. Este efecto es al contrario en el caso del colesterol donde la entrada es mayor que la salida.

La absorción intestinal de colesterol, medida mediante la administración de colesterol y sitostanol marcado, fue aproximadamente 88% en las dos líneas de ratones. Por tanto, aunque la muestra es pequeña, el resultado de absorción es

muy similar y permite descartar que haya una diferencia considerable en la absorción de colesterol entre las dos líneas de ratones.

Todos estos resultados son indicativos de que no hay diferencia en la absorción intestinal de colesterol ni de triglicéridos, ni tampoco en la pérdida de ácidos biliares y colesterol por las heces, entre los ratones control y los ratones transgénicos 11.1.

2. Transporte reverso de colesterol específico de macrófagos en ratones transgénicos de apoA-II humana.

Las HDL o sus apolipoproteínas libres son capaces de extraer el exceso de colesterol de los macrófagos a través del eflujo de colesterol y transportarlo al hígado donde se elimina a través de la bilis, y posteriormente en las heces.

La aproximación experimental empleada se basó en cargar macrófagos con colesterol y monitorizar el eflujo hacia HDL, su paso a hígado y posteriormente a bilis, con el objetivo de comprobar si existen diferencias en la capacidad de los ratones de extraer el colesterol de estos macrófagos y eliminarlo por las heces.

La estimación de este transporte reverso de colesterol específico se realizó utilizando macrófagos cargados con colesterol libre como han descrito Zhang y colaboradores [166]. En este método se cargan los macrófagos con colesterol libre marcado y se induce la transformación a células espumosas con LDL acetilada. Estos macrófagos se inyectaron en ratones de las dos líneas sometidos a 3 meses de dieta aterogénica. Los resultados obtenidos mediante esta aproximación se muestran en la Tabla R-9.

Tabla R-9. Transporte reverso de colesterol *in vivo* de macrófagos marcados con [³H] colesterol libre.

Los macrófagos de la línea P388D1 marcados con colesterol libre radiactivo fueron inyectados intraperitonealmente ($1,7 \times 10^6$ células con actividad $3,0 \times 10^6$ dpm en 0,5 mL de PBS en cada ratón) midiéndose la radiactividad en plasma, hígado y heces 48 h después de la inyección. Los valores se expresan como media \pm SEM. Las comparaciones se realizaron con el test U de Mann-Whitney.

	Control	Transgénicos 11.1
Número de animales	(4)	(4)
[³ H] colesterol en plasma (dpm/mL)	11850 \pm 802	8812 \pm 1438
[³ H] colesterol en HDL (dpm/mL)	3759 \pm 1064	2760 \pm 1401
[³ H] colesterol en No-HDL (dpm/mL)	8091 \pm 1376	6052 \pm 1435
[³ H] colesterol en hígado (dpm)	264300 \pm 54370	194400 \pm 47960
[³ H] colesterol libre en hígado (dpm)	133400 \pm 32080	89710 \pm 21220
[³ H] colesterol esterificado en hígado (dpm)	131000 \pm 24910	104700 \pm 26820
[³ H] colesterol fecal (dpm)	3206 \pm 491	2920 \pm 773
[³ H] en ácidos biliares fecales (dpm)	8846 \pm 844	8614 \pm 1690

La radiactividad existente en el plasma a las 48 h de la inyección de macrófagos no fue significativamente diferente en ratones control y transgénicos ($p=0,11$). La radiactividad existente en las fracciones HDL de ambos tipos de ratones tampoco mostró diferencias significativas. En radiactividad del precipitado, que contiene las lipoproteínas con apoB, se encontró una considerable proporción del marcaje presente en el plasma (un 70% en ambos grupos).

La medida del [³H] colesterol total en el extracto lipídico de hígado no mostró diferencias significativas en cuanto al colesterol total que llega al hígado a través del transporte reverso ($p=0,34$). En el hígado la proporción de radiactividad correspondiente colesterol libre fue similar en los dos modelos, resultando un 50% en ratones control y un 46% en transgénicos 11.1. La radiactividad que se encontró en los ácidos biliares y colesterol de heces después de su extracción tampoco mostró diferencias entre ratones control y ratones transgénicos 11.1.

El colesterol libre es una molécula hidrofóbica, pero con un cierto componente polar. Debido a esta característica, la transferencia de colesterol entre las membranas celulares y las lipoproteínas podría darse en parte de manera pasiva y no ser sólo reflejo de un transporte reverso altamente específico. Por ello, se modificó el método original para incorporar ésteres de colesterol radiactivos en macrófagos. Los ésteres de colesterol fueron incorporados a LDL mediante la acción de la CETP y éstas se acetilaron antes de su incubación con los macrófagos. Los resultados se muestran en la [Tabla R-10](#).

Tabla R-10. Transporte reverso de colesterol *in vivo* de macrófagos marcados con oleato de [³H] colesterol.

Macrófagos de la línea P388D1 marcados con oleato de colesterol fueron inyectados intraperitonealmente ($13,5 \times 10^6$ células, conteniendo $3,0 \times 10^5$ dpm en 0,5 mL de PBS) en ratones control y transgénicos 11.1 en dieta aterogénica y se midió la radiactividad en plasma a las 24 h, y en plasma, hígado y heces a las 48 h después de la inyección. Los valores se expresan como media \pm SEM, (*) indica diferencia significativa respecto a control ($p < 0,05$) en un test U de Mann-Whitney.

	Control	Transgénicos 11.1
Número de animales	(8)	(8)
[³ H] colesterol en plasma (dpm/mL) 24 h	3129 \pm 420	3139 \pm 335
[³ H] colesterol en HDL (dpm/mL) 24 h	1178 \pm 185	862,5 \pm 92
[³ H] colesterol en No-HDL (dpm/mL) 24 h	1951 \pm 302	2277 \pm 360
[³ H] colesterol en plasma (dpm/mL) 48 h	2216 \pm 645	2366 \pm 406
[³ H] colesterol en HDL (dpm/mL) 48 h	568,7 \pm 161	744,4 \pm 258
[³ H] colesterol en No-HDL (dpm/mL) 48 h	1647 \pm 646	1622 \pm 314
[³ H] colesterol total en Hígado (dpm) 48 h	45932 \pm 6205	37030 \pm 3841
[³ H] colesterol libre en Hígado (dpm) 48 h	22437 \pm 3574	21670 \pm 2578
[³ H] colesterol esterificado en Hígado (dpm) 48 h	23495 \pm 3264	15370 \pm 1652 (*)
[³ H] colesterol fecal (dpm) 48 h	642,6 \pm 89	580,9 \pm 112
[³ H] en ácidos biliares fecales (dpm) 48h	1054 \pm 111	1158 \pm 149

Como puede observarse en la citada tabla, la medida de [³H] colesterol en el plasma a las 24 y 48 h no mostró diferencias entre los ratones control y los transgénicos 11.1, tanto en la radiactividad total en plasma como en la radiactividad en las fracciones HDL y no HDL. La mayor parte de la radiactividad de [³H] colesterol se encontró en las lipoproteínas con apoB tanto a las 24 horas (73% en transgénicos 11.1 y 62% en ratones control) como a las 48 horas (68% en transgénicos 11.1 y 74% en ratones control).

A las 48 h de la inyección se evaluó el [³H] colesterol que había pasado de los macrófagos al hígado y de éste a las heces, a través de la bilis. La radiactividad que se detectó en el hígado no presentó diferencia significativa ($p=0,50$), aunque mostró una ligera tendencia a estar aumentada en ratones control. Esta tendencia fue debida a que la radiactividad del colesterol esterificado del hígado de los transgénicos 11.1 fue un 35% menor que la de los ratones control ($p=0.04$). Por contra, la cantidad de [³H] colesterol libre hepático no mostró diferencias entre control y 11.1.

Sin embargo, en la evaluación la eliminación de colesterol y ácidos biliares por las heces, que es la última etapa del transporte reverso de colesterol, no se encontraron diferencias entre ratones control y 11.1.

Discusión

Discusión capítulo 1:

Protección de las HDL frente a la oxidación

Las partículas de HDL contienen principalmente apoA-I y apoA-II en su fracción proteica, pero las HDL contienen además un gran número de proteínas menos abundantes que las hacen estructural, funcional y metabólicamente heterogéneas. A pesar de que numerosos estudios han demostrado que el colesterol de HDL está inversamente relacionado con el riesgo de arteriosclerosis en poblaciones humanas, la medida del colesterol total de HDL es una medida indirecta de los efectos protectores de las partículas de HDL frente a la arteriosclerosis. Por ejemplo, los ratones transgénicos para la apoA-II murina tienen elevados niveles de colesterol de HDL pero estas HDL son proinflamatorias [36]. Estos ratones presentan una susceptibilidad a la arteriosclerosis aumentada, de manera similar a lo encontrado en ratones transgénicos de LCAT [79]. Por otro lado, la administración de péptidos sintéticos de apoA-I en modelos animales producen un dramático descenso de la arteriosclerosis sin cambiar los niveles de colesterol de HDL [177]. Por tanto, la composición de las partículas de HDL determina sus funciones y propiedades antiaterogénicas.

La apoA-I se ha relacionado con diversas acciones antiaterogénicas de las HDL, como el eflujo de colesterol, activación de la LCAT (de la cual es cofactor necesario) estabilización de la HDL, asociación de enzimas protectores, y protección de la modificación oxidativa de lipoproteínas con apoB. Por el contrario, la función de la apoA-II en las HDL y en el metabolismo lipoproteico y la susceptibilidad a la arteriosclerosis continúa siendo poco conocida. La sobreexpresión de apoA-II humana en ratones transgénicos provoca una alteración en la maduración de las HDL mediada por LCAT, un incremento en las lipoproteínas con apoB y un aumento de susceptibilidad a la arteriosclerosis [20,150],[40], [33], [168].

En este estudio se han explorado los mecanismos responsables de la mayor susceptibilidad a la arteriosclerosis de este modelo murino y, más concretamente, en este capítulo se ha analizado si la alteración de la capacidad protectora de las

HDL frente a la oxidación de las LDL puede jugar un papel en la génesis del proceso arteriosclerótico en los ratones transgénicos de apoA-II humana.

En los ratones 11.1 la sobreexpresión de apoA-II humana no solo aumentó el área total de lesión arteriosclerótica de manera muy acentuada en dieta aterogénica, como ya había sido descrito en anteriores trabajos de nuestro grupo, sino que además promovió un aumento en la cantidad de epítomos oxidados en la lesión. Estos resultados apuntan a que los procesos oxidativos están implicados en la mayor susceptibilidad a la arteriosclerosis que se encuentra en esta línea de animales.

A pesar de encontrar un aumento considerable de epítomos oxidados en la lesión arteriosclerótica, con los métodos utilizados no se encontró un aumento paralelo en los marcadores de oxidación lipídica en plasma. Tanto el 8-isoprostano, que es un derivado estable de la oxidación de ácido araquidónico, como los TBARS, que son aldehídos y cetonas derivados de la oxidación de diversos ácidos grasos poliinsaturados no mostraron diferencias. Estos resultados sugieren que existe un nivel de oxidación de las lipoproteínas en el plasma similar entre las diferentes líneas de ratones y que los procesos oxidativos que afectan a las lipoproteínas ocurren principalmente en el espacio subendotelial. Esto puede ser debido a la presencia de numerosas moléculas antioxidantes en el plasma como la albúmina, glutatión, ácido ascórbico, ácido úrico o bilirrubina, que serían suficientes para evitar la oxidación de las lipoproteínas en el plasma. Sin embargo, la modificación oxidativa puede tener lugar en el espacio subendotelial, donde las lipoproteínas pueden ser retenidas por los proteoglicanos de la matriz y son susceptibles de ser oxidadas por los radicales libres y por los enzimas oxidantes liberados por las células. De hecho, las lipoproteínas con apoB son retenidas en el espacio subendotelial, encontrándose el doble de concentración que en el plasma y favoreciendo que puedan ser modificadas por oxidación [139]. En este microambiente y debido a que las HDL no son retenidas en el espacio

subendotelial, la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de las HDL pueden ser vitales para limitar este proceso [140].

Las lipoproteínas al sufrir modificación oxidativa incrementan su carga eléctrica y consecuentemente también su movilidad electroforética. Esta propiedad puede ser utilizada para establecer el grado de oxidación de la LDL y se ha utilizado previamente para monitorizar la capacidad de las HDL de proteger a lipoproteínas con apoB [173]. Este sistema permite monitorizar la movilidad de la LDL sin necesidad de separarla de la HDL previamente, evitando la aparición de artefactos en la separación. Utilizando esta aproximación, la HDL de ratones transgénicos 11.1 incubada tanto con lipoproteínas con apoB propias, como con LDL humana demostraron tener una menor capacidad protectora frente a la oxidación que la que presentaron las HDL de ratones control.

La peroxidación de los lípidos en lipoproteínas generada por radicales libres, sucede a través de una secuencia de eventos que comprende fases de iniciación, propagación y terminación. La fase de latencia puede ser prolongada por antioxidantes, los cuales secuestran la reacción iniciadora o interfieren en las especies que propagan la reacción [174] y refleja la capacidad antioxidante de las lipoproteínas. Las HDL de los ratones control y transgénicos 25.3 son capaces de retrasar la fase de latencia de la oxidación de la LDL, pero las HDL de los ratones transgénicos 11.1 lo hacen en mucho menor grado. La capacidad antioxidante de las HDL de los ratones 11.1 está pues, según este ensayo, muy por debajo de la capacidad presentada por las HDL de las otras dos líneas de ratones.

La incubación de cocultivos de células endoteliales y musculares lisas con LDL ha venido siendo utilizada para estudiar la capacidad antiinflamatoria de las HDL. En estos ensayos la LDL es oxidada en el medio de cultivo, induce una respuesta inflamatoria en el cultivo celular y el sobrenadante de estas células es capaz de inducir la trans migración de monocitos. En este modelo las HDL normales son capaces de evitar esta oxidación y la posterior trans migración [35,64,116]. El

ensayo de incubación LDL junto con diacetato de fluoresceína (DCF) fue desarrollado por Navab et al. [162] para el mismo fin, pero con la ventaja de que este método no requiere cultivos celulares, y puede adaptarse a gran número de muestras. Este método demostró ser igual de eficaz para detectar HDL disfuncionales en su capacidad antiinflamatoria que el método de la trans migración de monocitos [162]. El ensayo con DCF se basa en que las especies reactivas generadas por la LDL al oxidarse reaccionan con el DCF emitiendo fluorescencia que puede ser detectada, siendo ésta proporcional al grado de oxidación. Las HDL normales son capaces de evitar la oxidación y por tanto también la emisión de fluorescencia. La incapacidad de las HDL de los ratones 11.1 de evitar la fluorescencia generada por la LDL en el mismo grado que lo hacían las HDL de ratones control y 25.3, vuelve a ser indicativo de la su deficiente capacidad antioxidante y antiinflamatoria.

En ciertos estudios que utilizaron ensayos de trans migración de monocitos, algunas HDL no sólo no protegían frente a la oxidación o la inflamación, sino que además por sí mismas eran capaces de provocar trans migración de monocitos, como es el caso de las HDL de ratones transgénicos para la apoA-II de ratón [35]. Sin embargo, en los resultados de los ensayos con DCF con las HDL de ratones 11.1, aunque no son capaces de proteger de la oxidación, no sugieren que las HDL de estos ratones sean prooxidantes o proinflamatorias. El nivel de oxidación de las LDL incubadas con estas HDL estuvo por debajo o en un nivel similar que las LDL incubadas solas. De haber sido prooxidantes se esperaría que estimularan la oxidación y se hubiera observado un nivel de oxidación superior en las LDL con HDL de transgénicos 11.1 que en las LDL oxidadas solas. En cualquier caso no se puede descartar totalmente esta posibilidad, al no haberse realizado ensayos de trans migración de monocitos.

Los HODEs son productos finales de la oxidación del ácido linoleico. El hecho de que los HODEs se encontraran aumentados en las LDL que habían sido incubadas junto con las HDL de los ratones 11.1, respecto a las LDL incubadas con

las HDL de las otras dos líneas de ratones, indica un mayor grado de oxidación, y por tanto, una menor protección por parte de las HDL de 11.1. Esto es consistente con los resultados obtenidos con los otros ensayos de capacidad protectora de la HDL.

Por tanto, diferentes aproximaciones experimentales muestran que las HDL de los ratones transgénicos 11.1 que sobreexpresan apoA-II humana tienen afectada la capacidad de proteger de la oxidación de lipoproteínas con apoB.

Al estudiar las características de las HDL de estos ratones se observó una clara alteración en su composición, tanto de lípidos como de apolipoproteínas. Las HDL de los ratones transgénicos presentaron menor diámetro, menor cantidad de colesterol y la apolipoproteína principal fue la apoA-II humana, en concordancia con anteriores estudios [40,150]. Estos cambios de composición alteraron incluso la movilidad electroforética de las HDL de 11.1, como puede observarse en las electroforesis en gel de agarosa, ya que estas HDL migran menos que las HDL de control y 25.3. Ya que las partículas de HDL de 11.1 son más pequeñas que las de control y 25.3 la menor movilidad indica una menor carga eléctrica de la partícula. Por otra parte, la tinción menos intensa con Negro Sudán es debida probablemente a la menor cantidad de ésteres de colesterol en las HDL de 11.1.

Es bien conocido que algunos antioxidantes lipofílicos son capaces de evitar o retrasar la oxidación de las lipoproteínas [161,174]. Sólo los niveles de α -tocoferol fueron detectables en la HDL de las tres líneas de ratones, pero no se encontró diferencia entre las diferentes líneas, lo cual no apoya que las lipoproteínas de los ratones 11.1 ofrezcan menor protección de la oxidación que las HDL de control y 25.3 debido a una menor cantidad de tocoferol.

Otros factores implicados en la protección de las lipoproteínas contra la oxidación son ciertas apolipoproteínas y enzimas antioxidantes presentes en la HDL. La capacidad de la apoA-I de protección frente a la oxidación ha sido

descrita con detalle, tanto *in vivo* como *in vitro* [140,142]. En los ratones transgénicos 11.1 hay una deficiencia considerable de apoA-I [40], que sin duda puede contribuir a explicar la protección frente a la oxidación disminuida y el aumento de arteriosclerosis en la línea 11.1. Sin embargo, ratones deficientes en apoA-I no muestran una susceptibilidad a la arteriosclerosis aumentada, ni siquiera cuando son alimentados con una dieta aterogénica [16] y sólo muestran aumento de arteriosclerosis cuando la apoB humana es expresada también en estos ratones [17]. Esto sugiere de manera consistente que la deficiencia de apoA-I por sí sola no es suficiente para explicar aumento de susceptibilidad a la arteriosclerosis, y que, por tanto, es la sobreexpresión de la apoA-II humana la que perjudica la capacidad antioxidante de las HDL de los ratones 11.1.

Las paraoxonasas son una familia de enzimas calcio dependientes [111] y, por tanto, su actividad arilesterasa y paraoxonasa puede ser inhibida efectivamente por el EDTA, que es capaz de quelar los iones de calcio. En un tampón que contiene EDTA, la arilesterasa del plasma de los ratones no se inhibe completamente, indicando que hay otro u otros enzimas en el plasma con actividad arilesterasa que son calcio independientes. Este fenómeno ya fue observado en los ratones *knockout* de PON1 [116] donde la actividad paraoxonasa (medida utilizando paraoxón como sustrato) desapareció, en contraste con la actividad arilesterasa que no desapareció totalmente. La actividad arilesterasa EDTA-resistente es debida probablemente a carboxilesterasas del plasma que no están asociadas a lipoproteínas. Esta familia de enzimas posee actividad arilesterasa y no son calcio dependientes [178,179], pero en cambio son inhibidas por PMSF.

Los resultados obtenidos en HDL aislada por ultracentrifugación, muestran que toda la actividad arilesterasa de HDL era inhibida por EDTA, mientras que la actividad arilesterasa del LPD era EDTA-resistente. También en los perfiles de FPLC se distingue claramente un pico de actividad arilesterasa en las fracciones correspondientes a HDL, atribuible a la PON1 y otro pico en las fracciones de LPD

o fracciones sin lipoproteínas, atribuible a otro/s enzimas. Por tanto, la medida de la PON1 utilizando fenilacetato puede medirse como actividad arilesterasa EDTA-sensible en ratones, evitando así el uso de la actividad PON1 medida con paraoxón, que es un compuesto extremadamente tóxico. También podría haberse utilizado la medida de arilesterasa PMSF sensible, es decir inhibiendo las carboxilesterasas con PMSF. La elección de utilizar la actividad arilesterasa EDTA-sensible en lugar de la arilesterasa PMSF-resistente como medida de la PON1, es debida principalmente a que se debe preincubar la muestra con PMSF un tiempo para inhibir completamente a las carboxilesterasas, mientras que la inhibición de la PON1 por el EDTA es inmediata. Además, no se conoce si hay otros enzimas en el plasma de ratón con actividad arilesterasa que no sean inhibibles por el PMSF aparte de la PON1.

Estos resultados son consistentes con lo descrito recientemente por Connelly y cols. [158] que demostraron que la arilesterasa asociada a HDL es de hecho PON1, mientras que las carboxilesterasas son las responsables de la actividad arilesterasa no asociada a lipoproteínas. Estas diferencias de actividad no se encuentran en humanos, donde en los ensayos preliminares realizados toda la actividad arilesterasa del plasma fue inhibida por el EDTA, y por tanto es atribuible a la PON1.

Usando esta aproximación se pudo determinar que la actividad de la PON1 en los ratones 11.1 era aún más baja de lo que aparentaba ser mediante la medición de actividad arilesterasa. La deficiencia en este enzima puede ser de gran relevancia a la hora de explicar la disfunción en la capacidad antioxidante de las HDL de ratones 11.1 ya que este enzima se ha asociado a la protección de la oxidación de las HDL [118]. Ratones deficientes en PON1 son incapaces de proteger de la oxidación a la LDL [116,117], y HDL de ratones transgénicos para la apoA-II murina que presentan una actividad específica disminuida de PON1 no protegen de la oxidación, e incluso, son proinflamatorias [35].

Las HDL de los ratones 11.1 tienen una menor cantidad de PON1 en sus HDL además de tener menor cantidad de HDL en el plasma [33]. La deficiencia de apoA-I podría afectar la estabilidad o la actividad de la PON1 en la partícula de HDL [180]. Aunque la PON1 puede asociarse a la HDL en ausencia de apoA-I, la unión es mucho menor [181]. En otros estudios se ha demostrado que se requiere la apoA-I para que la PON1 sea estable y tenga máxima actividad [112,182].

Los marcados cambios en la composición y propiedades de las HDL no son debidas a diferencias de expresión de los RNA mensajeros de las apolipoproteínas ni enzimas estudiados, a pesar del gran nivel de transcripción del transgén. Consecuentemente, la deficiencia de apoA-I, PON1 y PAF-AH que se encuentran en los ratones transgénicos 11.1 debe tener su origen a nivel post-trascripcional. Los experimentos de incubación de plasma y HDL con apoA-II humana pura sugieren que los cambios son desencadenados por la unión de la apoA-II humana a la HDL.

Al incubar apoA-II humana con plasma de ratón control a 37°C se encontró una disminución en la actividad PON1 en plasma y en HDL. Sin embargo, este efecto no se encontró cuando las incubaciones fueron realizadas a 4°C. La actividad PAF-AH no cambió a ninguna de las dos temperaturas. Esto podría indicar un desplazamiento de la PON1 de la partícula de HDL y en este desplazamiento se produce un cambio de conformación que inactiva la actividad arilesterasa del enzima. La dependencia de la temperatura de este fenómeno sugiere que alguna actividad enzimática podría estar implicada, como podría ser el caso de la PLTP o de la HL, las cuales pueden estar asociadas a HDL. Otra posible explicación sería el requerimiento de cierta fluidez en la superficie de la partícula de HDL para que la apoA-II efectuara el desplazamiento de la PON1. El desplazamiento de la apoA-I por apoA-II humana *in vitro* ya había sido descrito sobre la apoA-I de la HDL [168], indicando que la afinidad que tiene la apoA-II humana por la superficie de la HDL puede provocar cambios en la estructura de la partícula.

Un efecto interesante del desplazamiento es que la PON1 además de ser desplazada de la partícula de HDL pierde su actividad arilesterasa. Esto podría indicar que la PON1 puede ser más inestable y/o cambiar de conformación, separada de la partícula de HDL y de la estabilización de la apoA-I.

En cualquier caso, el desplazamiento de la PON1 podría dar lugar al enzima libre de lípidos con un elevado recambio en el plasma y con una menor estabilidad, ocasionando una menor actividad de PON1 en HDL y en el plasma de los ratones transgénicos. Se ha descrito el desplazamiento de PON1 de la HDL inducido por incubación con proteína sérica amiloide A [180], lo cual podría ser importante para explicar la pérdida de capacidad antiinflamatoria de las HDL durante la respuesta a fase aguda.

El desplazamiento de la PON1 por concentraciones fisiológicas de apoA-II *in vitro* podría explicar, al menos en parte, por qué la PON1 se asocia a partículas con apoA-I y sin apoA-II [183], como ha sido descrito al estudiar la distribución de la PON1 en las diferentes fracciones de HDL [184], separadas por su densidad.

La PAF-AH está asociada a HDL en ratones y protege contra la oxidación de lipoproteínas y el desarrollo de la arteriosclerosis [185]. Este enzima se asocia principalmente a HDL en ratones, pero en humanos, por el contrario, dos terceras partes de la actividad se asocian a la LDL y una tercera parte a la HDL [124]. En los ratones transgénicos 11.1 se encontró una moderada aunque significativa reducción en actividad PAF-AH en plasma. En HDL, el perfil de FPLC mostró una disminución análoga con la encontrada en plasma e indicó que la mayor parte de PAF-AH está asociada a HDL. En la ultracentrifugación se encontró que la mayor parte de la PAF-AH pasaba a la fracción libre de lipoproteínas, indicando que la asociación de la PAF-AH con la HDL es relativamente débil y se perdía en parte debido a la fuerza centrífuga o a la elevada concentración de sales. Sin embargo, la actividad específica remanente en HDL después de la ultracentrifugación también era más baja en las HDL de los transgénicos 11.1. Conjuntamente las actividades

en plasma y el perfil de FPLC sugieren una asociación deficiente de la PAF-AH con la HDL enriquecida en apoA-II. Aunque se ha descrito que la PON1 tiene capacidad de hidrolizar el PAF [114], la actividad PAF-AH encontrada en HDL de los ratones muy probablemente no es debida a la PON1 ya que en el tampón de ensayo contenía EGTA, que es quelante e inactivaría la PON1.

La LCAT, además de su actividad de esterificación de colesterol en plasma utilizando la apoA-I como cofactor, también ha sido descrita su capacidad antioxidante [82], aunque existe cierta controversia [83]. En anteriores trabajos en nuestro laboratorio se describió una deficiencia funcional de LCAT en los ratones transgénicos 11.1 debidos a la deficiencia de apoA-I [33], pero una cantidad similar del enzima en el plasma, medido como actividad frente a un sustrato artificial (actividad exógena). Paralelamente a lo encontrado con la PAF-AH, la ultracentrifugación provoca que la LCAT deje de estar asociada a HDL, como indica el perfil FPLC, y pase al LPD en la ultracentrifugación.

La glutathion selenoperoxidasa plasmática (GPX3) es el único enzima de su familia que se encuentra en el plasma y ha sido descrita como un enzima con asociación a HDL en humanos, con capacidad para inactivar hidróxidos orgánicos [128]. Por este motivo este enzima seria buen candidato para explicar diferencias en la capacidad protectora de las HDL. Sin embargo, no se encontró actividad glutathion peroxidasa en HDL sino toda en el LPD, tanto en el perfil de FPLC como en ultracentrifugación. Además no se encontraron diferencias de actividad entre las tres líneas de ratones.

Los datos sugieren que la disminución de PON1, PAF-AH y apoA-I en las HDL de los ratones 11.1 pueden jugar un papel determinante en la disminución de su capacidad antioxidante. Estos resultados son parcialmente consistentes con los resultados obtenidos en ratones transgénicos de apoA-II de ratón [35]. En estos animales la disminución de PON1 fue observada sólo como actividad específica, es decir, cuando la actividad se corrigió por proteína de HDL. Adicionalmente

estas HDL demostraron ser proinflamatorias en ensayos de trans migración de monocitos. Sin embargo, el colesterol de HDL de los ratones transgénicos de apoA-II de ratón estaba aumentado, situación opuesta a la encontrada en los transgénicos 11.1, donde hay una clara deficiencia de HDL. Esta puede ser otra diferencia especie-específica de la apoA-II, que podría ser debida a una mayor afinidad de la apoA-II humana por la superficie de HDL que la apoA-II de ratón [20].

Boisfer y colaboradores describieron que las HDL de los transgénicos de apoA-II humana generados independientemente de nuestra línea [44], protegían a las VLDL relativamente más de lo que lo hacían las de los ratones control, en incubaciones de estas lipoproteínas con cobre, reaislándolas mediante ultracentrifugación y midiendo TBARS en ellas. Con esta aproximación experimental concluyeron que las HDL de estos animales tenían una capacidad protectora mayor, a pesar de la disminución de enzimas antioxidantes, sugiriendo un papel antioxidante directo de la apoA-II. Estos autores describieron una disminución de PON1 y PAF-AH plasmática en su ratones transgénicos de apoA-II humana y una disminución de colesterol HDL. Sin embargo la disminución de PON1 y PAF-AH fue menos pronunciada que la de los transgénicos 11.1. Por tanto, en estos ratones la actividad específica de estos enzimas por unidad de proteína era superior, en contraste de lo encontrado en los ratones 11.1 o los transgénicos de apoA-II murina [35].

Las razones de las discrepancias entre este estudio y nuestros resultados no están claros, sin embargo hay varios factores que podrían explicarlas. En primer lugar el estudio de Boisfer y cols. se realizó en dieta estándar, y los niveles de apoA-II plasmáticas fueron mucho más bajas que en los ratones 11.1 (alrededor de 40 mg/dL frente a unos 120 mg/dL en los ratones 11.1). Sin embargo, la actividad específica aumentada de PON1 y PAF-AH que se observó en estos ratones no fue encontrada en nuestros 11.1 en dieta estándar. Por tanto las diferencias mencionadas u otras características desconocidas pueden ser las determinantes del

diferente comportamiento respecto a la capacidad protectora de las HDL de estos ratones y los transgénicos 11.1.

Se ha descrito que la sustitución de la región central de la apoA-I por un fragmento de la apoA-II en ratones transgénicos deteriora la capacidad de la HDL para proteger de la oxidación a las LDL [186]. En dieta aterogénica está bien descrito que la PON1 disminuye su transcripción y su actividad plasmática [187], por tanto mayores concentraciones de apoA-II podrían empeorar el resto del sistema antioxidante formado por la apoA-I, la PAF-AH y eventualmente, la LCAT. Por tanto, aunque la apoA-II es un componente de las partículas de HDL tradicionalmente antiaterogénicas, estos estudios apuntan a que el aumento de apoA-II no sería una diana terapéutica para reducir la arteriosclerosis.

Este estudio aporta evidencias del deterioro de la capacidad antioxidante de las HDL de ratones que sobreexpresan apoA-II humana. Una disminución de apoA-I, paralelamente con una disminución de PON1 y PAF-AH probablemente están relacionados tanto con esta disminución de capacidad antioxidante como con el gran aumento de arteriosclerosis en estos ratones.

Discusión capítulo 2:

Transporte reverso de colesterol

En el metabolismo del colesterol se considera que hay dos flujos principales. El denominado flujo centrífugo, en el cual el colesterol viaja desde el hígado formando parte de las lipoproteínas con apoB hacia los tejidos periféricos. El flujo centrípeto, también denominado transporte reverso de colesterol, tiene su inicio en el eflujo de colesterol, en el que las células del organismo transfieren colesterol a aceptores del plasma mediante procesos pasivos o activos que implican proteínas de membrana (especialmente ABCA1). Los aceptores del colesterol son partículas de HDL, que maduran y se convierten en α -HDL gracias a la LCAT y a otros enzimas, y finalmente transfieren el colesterol al hígado donde podrá ser eliminado a través de la bilis y posteriormente, las heces. Este proceso es de vital importancia para la prevención de la arteriosclerosis ya que la acumulación de lipoproteínas con apoB en la capa íntima de las arterias y su modificación conduce a la formación de células espumosas. La HDL puede evitar la modificación de las LDL, y puede extraer el exceso de colesterol de los macrófagos a través del transporte reverso de colesterol, evitando así la transformación de los macrófagos a células espumosas. Tradicionalmente se ha asignado a esta capacidad de eliminar el exceso de colesterol de tejidos como la principal propiedad antiaterogénica de las HDL, una capacidad en el que la apoA-I ha demostrado tener gran importancia [166] y que podría explicar, al menos en parte, la capacidad antiaterogénica de esta apolipoproteína [11].

Varios estudios han monitorizado el transporte reverso de colesterol midiendo la síntesis periférica de colesterol, que en estado estacionario es aproximadamente igual al flujo centrípeto de colesterol al hígado. Estos estudios mostraron que tanto la sobreexpresión como la deficiencia en apoA-I no modifican la tasa global de transporte reverso de colesterol [188-190]. Sin embargo, estos estudios no proporcionan información sobre el transporte específico desde macrófagos, posiblemente la estirpe celular más importante en el proceso aterosclerótico. El seguimiento del transporte reverso de colesterol marcado con tritio desde los macrófagos hasta las heces en ratones transgénicos apoA-I, demostró de manera

clara un transporte reverso de colesterol incrementado en estos animales resistentes a la arteriosclerosis [166].

A pesar de que el papel de la apoA-II las diferentes etapas de la vía de transporte reverso han sido estudiados con detalle [19,20,191,192], se conoce poco como la apoA-II regula el flujo de colesterol en su conjunto a través de esta vía. Hay cierto consenso en que la HDL con apoA-I y sin apoA-II (LpA-I) es más activa que la HDL conteniendo apoA-I y apoA-II (LpA-I/A-II) en el eflujo celular de colesterol, que es el primer paso del transporte reverso de colesterol [20,191]. Sin embargo, varios estudios en ratones modificados genéticamente que expresan apoA-II humana o murina han proporcionado resultados contradictorios. El plasma de ratones transgénicos para la apoA-II humana, desarrollados independientemente de nuestra línea, estimularon el eflujo de colesterol de macrófagos J774 en los que se aumentó la expresión ABCA1 [193], mientras que se observó un eflujo disminuido en células de hepatoma de rata Fu5AH que expresan SR-BI [193,194]. En estudios de eflujo de colesterol en cultivos de fibroblastos NRK hacia el plasma éste fue menor en el caso del plasma de los ratones 11.1 (alimentados en dieta estándar), lo que podía ser explicado por una deficiencia de HDL y apoA-I que presentaban estos transgénicos de apoA-II humana [40]. Sin embargo, cuando la medida del eflujo se realizó con plasma de animales sometidos a dieta aterogénica no se encontraron diferencias y los ratones transgénicos 11.1 mostraron la misma capacidad de inducir el eflujo de colesterol que los ratones control o los transgénicos 25.3 (que expresaban apoA-II a un nivel 5 veces inferior que la línea 11.1) [40]. En esta situación de dieta aterogénica es donde se encuentra una susceptibilidad a la arteriosclerosis aumentada, ya que estos animales no presentan susceptibilidad a la arteriosclerosis cuando son alimentados con dieta estándar. Por tanto, estos resultados no indicarían que una disminución del eflujo de colesterol celular pudiera estar implicada en el aumento de arteriosclerosis que presentan estos animales.

Se ha sugerido que la capacidad proaterogénica de la apoA-II humana en ratones transgénicos podrían deberse a una alteración en otros pasos del transporte reverso de colesterol, como los que dependen de la funcionalidad de apoA-I y LCAT, que se encuentra alterada en los ratones transgénicos 11.1 [33,40,150]. Esta deficiencia funcional de LCAT se ha explicado por la capacidad de la apoA-II de desplazar a la apoA-I de la partícula de HDL [33,168]. Al estar bloqueado el paso de maduración de HDL mediado por LCAT, en el que ésta esterifica el colesterol libre de las HDL, podría esperarse que el transporte reverso de colesterol estuviera disminuido.

Las HDL LpA-I son más activas que las LpA-I/A-II en la transferencia de ésteres de colesterol a través de SR-BI [195]. Así, HDL aisladas de animales transgénicos para la apoA-II humana o de ratón incubadas con células transfectadas con SR-BI mostraron una menor captación de ésteres de colesterol que las HDL de ratones control [168,196].

Por tanto, en los ratones 11.1, debido a que tienen una considerable deficiencia de apoA-I, se esperaría que tuvieran alteradas al menos alguna de las etapas de eflujo, maduración y captación de ésteres de colesterol.

Sin embargo, en estudios anteriores en nuestro laboratorio [197] se monitorizó el metabolismo de los ésteres de colesterol marcados de HDL en ratones control y transgénicos 11.1 sometidos a dieta aterogénica, encontrándose un catabolismo acelerado de los ésteres de colesterol marcados en los ratones transgénicos 11.1 (tasa catabólica fraccional $0,58 \pm 0,04$ en 11.1 respecto $0,38 \pm 0,01$ fracciones/h con $p < 0,05$), indicando que los ésteres de colesterol de HDL se aclaran del plasma más rápidamente en los ratones transgénicos 11.1. Ello sugiere que algunos pasos del transporte reverso de colesterol en transgénicos 11.1 podrían estar acelerados. Este tipo de estudios son aproximaciones parciales a la medida del transporte reverso, aunque el conjunto podrían explicar que no se encontrara una alteración en el

transporte reverso de colesterol de macrófagos que ha sido determinado en el presente estudio.

Es destacable la proporción de [³H] colesterol unido a lipoproteínas que contienen apoB que se encontró en ambas líneas de ratones, ya que se supone que el transporte reverso de colesterol se realiza a través de HDL. Los ratones no tienen actividad CETP detectable en plasma. Por tanto esto podría ser debido a la recirculación del colesterol que llega al hígado y es reempaquetado en VLDL o bien a la capacidad de la PLTP de estimular la transferencia de colesterol entre diferentes lipoproteínas [91,198].

Los resultados obtenidos con el marcaje de los macrófagos con colesterol libre, realizado como está descrito por Zhang y cols. [166], no permiten afirmar que el transporte reverso de colesterol en los ratones transgénicos 11.1 esté alterado, ya que no hay diferencias en los valores de radiactividad de [³H] colesterol en plasma, en hígado ni en heces de ratones 11.1 respecto a los ratones control. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias considerables cuando este experimento se realizó con macrófagos marcados con oleato de colesterol. Sin embargo, aunque la radiactividad del colesterol hepático total no fue diferente, el [³H] colesterol esterificado en el hígado se encontró disminuido en transgénicos 11.1 respecto de los ratones control. Por otro lado, la radiactividad del colesterol libre no fue diferente. Se podrían plantear varias hipótesis que pueden explicar esta disminución en el colesterol esterificado hepático en los ratones 11.1. La secreción aumentada de VLDL descrita en los ratones transgénicos 11.1 [149], podría movilizar colesterol esterificado del hígado, ocasionando esta disminución. Por otro lado, la deficiencia de LCAT descrita en estos ratones podría ocasionar a una menor esterificación de colesterol en plasma y a una menor captación de colesterol esterificado por parte del hígado en los ratones transgénicos. No se pueden descartar otras hipótesis, como una esterificación de colesterol menor en el hígado de los ratones transgénicos. Por ello se requieren estudios adicionales para profundizar en este aspecto.

No obstante, la última etapa del transporte reverso de colesterol, en la cual el colesterol hepático pasa a la bilis en forma de colesterol o ácidos biliares y es eliminado por las heces, no mostró diferencias entre transgénicos 11.1 y ratones control en ninguno de los métodos utilizados. Por tanto, la eficiencia de eliminar el colesterol que proviene de macrófagos a través de las heces no está comprometida en estos ratones, a pesar de su deficiencia de HDL.

No se encontraron diferencias en la eliminación de ácidos biliares y colesterol por las heces, tanto en el experimento de transporte reverso como en la monitorización de entrada y salida de colesterol y ácidos biliares. Ello indica que aun en el caso de que pudieran llegar más ácidos biliares y colesterol a la bilis, éstos se reabsorberían eficientemente en el intestino entrando de nuevo en la circulación enterohepática.

El resultado más destacable es que la expresión de apoA-II puede efectuar el transporte reverso de colesterol desde macrófagos al hígado y finalmente a las heces, a pesar de la deficiencia de HDL en los ratones transgénicos. Estos resultados confirman la visión de que cambios en el flujo de colesterol a través del espacio vascular causado por cambios en los niveles de apoA-I, afectan profundamente el estado estacionario de las concentraciones de HDL, pero podrían tener poco efecto en la magnitud del transporte reverso de colesterol [188-190,199]. Además estos resultados apoyan el concepto de que el colesterol de HDL no es un buen marcador de la eficiencia del flujo de colesterol desde la periferia hacia el hígado, al menos el inducido de estirpes celulares como los macrófagos [200,201].

Los altos niveles de expresión de los ratones transgénicos de apoA-II (100-130 mg/dL) son mucho mayores que los niveles observados en humanos (20-45 mg/dL). Sin embargo, no parece probable que una expresión más modesta de apoA-II humana pueda resultar en un transporte reverso macrófago-específico

reducido respecto de los ratones control, particularmente si coinciden con niveles de apoA-I normales [150,166,168].

El método que utiliza colesterol libre el marcaje de macrófagos es más sencillo y se consigue un marcaje más eficiente, mientras que con el método de marcar las LDL con oleato de colesterol se perdió algo de sensibilidad debido a que los macrófagos incorporaron menos radiactividad. En el experimento de marcaje con colesterol libre se inyectó diez veces más radiactividad, pero los valores de radiactividad determinados en el experimento de marcaje con oleato de colesterol son sólo entre 3 y 6 veces menores. Esta aparente mayor eficiencia en el experimento de medida de transporte reverso marcando con oleato de colesterol podría ser explicado por el hecho de que se inyectaron unas 8 veces más macrófagos que en el marcaje con colesterol libre.

En el método de marcaje con colesterol libre éste se incorpora de manera pasiva a las membranas celulares de los macrófagos y desde allí pasa a las HDL a través del eflujo de colesterol. Además se estimuló la formación de células espumosas, cargando los macrófagos con LDL acetiladas, las cuales son ávidamente fagocitadas por los macrófagos a través de receptores *scavenger*.

En el método del marcaje con oleato de colesterol, éste se incorpora a micelas, se transfiere a LDL a través de la acción de la CETP, posteriormente se acetilan las LDL y los macrófagos las incorporan. En cada uno de estos pasos, y especialmente en el último, se pierde radiactividad. Con esta modificación se pretendía que los macrófagos incorporaran oleato de [³H] colesterol al interior celular y para realizar el eflujo tuvieran que hidrolizarlo, ya que se asume que el colesterol se transfiere inicialmente a HDL está en forma no esterificada [202]. Además, este proceso es una aproximación análoga a la formación de células espumosas en las lesiones arterioscleróticas. Efectivamente, se observa que parte del [³H] colesterol que estaba esterificado en los macrófagos se encontró en forma no esterificada en el

hígado, indicando que en algún momento ha sido hidrolizado, posiblemente en el macrófago para efectuar el eflujo o a su llegada al hígado.

En consecuencia, estos datos en su conjunto no permiten afirmar que la hiperexpresión de apoA-II humana cause una disminución en el transporte reverso de colesterol desde macrófagos y más bien sugieren que la apoA-II humana es funcional induciendo este proceso, al menos en las condiciones estudiadas. Por tanto, la alteración del transporte reverso de colesterol desde macrófagos no parece explicar la gran susceptibilidad a la arteriosclerosis que presentan estos animales en dieta aterogénica. Los mecanismos proaterogénicos inducidos por la sobreexpresión de la apoA-II humana podrían atribuirse más bien a otros factores como la disminución de las actividades antioxidantes/antiinflamatorias de las HDL ricas en apoA-II [35,203], y a la hiperlipemia que presentan estos animales [41,42].

Conclusiones

Capacidad protectora de las HDL frente a la oxidación de las lipoproteínas con apoB.

1. Los ratones transgénicos de apoA-II humana de la línea 11.1 presentan un aumento del área de lesión aórtica, así como de epítomos derivados de oxidación en estas lesiones, respecto de los ratones control.
2. Las HDL de los ratones transgénicos 11.1 proporcionan una menor capacidad de protección frente a la oxidación de lipoproteínas con apoB que las HDL de ratones control y de transgénicos 25.3.
3. Las HDL de los ratones transgénicos 11.1 presentan una composición alterada caracterizada por la disminución de apoA-I, PON1 y PAF-AH, lo que probablemente explica la menor protección frente a la oxidación que proveen estas HDL.
4. Los cambios mencionados y encontrados en las partículas de HDL no son debidos a cambios en la transcripción de los genes de apoA-I, PON1, PAF-AH ni LCAT.
5. La apoA-II humana es capaz de desplazar la PON1 de la partícula de HDL. Este mecanismo podría explicar la falta de colocación de PON1 y apoA-II en las partículas de HDL humana.

Transporte reverso de colesterol específico de macrófagos

1. A pesar de la deficiencia parcial de HDL que presentan, los ratones transgénicos 11.1 no presentan una alteración importante en el ritmo de transporte reverso de colesterol específico de macrófagos respecto de los ratones control.

Conclusiones globales

1. La alteración en la capacidad antioxidante de las HDL de transgénicos 11.1 puede explicar en parte la susceptibilidad a la arteriosclerosis aumentada en estos animales en dieta aterogénica.
2. La susceptibilidad a la arteriosclerosis en ratones transgénicos 11.1 alimentados con dieta aterogénica, no parece ser atribuible a una disminución del transporte reverso de colesterol específico de macrófagos, a pesar de la deficiencia parcial de HDL que presentan.

Bibliografía

1. Manninen V, Elo MO, Frick MH, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, et al. Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Jama*. 1988;260:641-51.
2. Fruchart JC, Ailhaud G, Bard JM. Heterogeneity of high density lipoprotein particles. *Circulation*. 1993;87:III22-7.
3. Skinner ER. High-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5:241-7.
4. Lund-Katz S, Liu L, Thuahnai ST, Phillips MC. High density lipoprotein structure. *Front Biosci*. 2003;8:d1044-54.
5. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:13-27.
6. Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezon E, Champagne E, Pineau T, Georgeaud V, Walker JE, Terce F, Collet X, Perret B, Barbaras R. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*. 2003;421:75-9.
7. Brewer HB, Jr., Fairwell T, LaRue A, Ronan R, Houser A, Bronzert TJ. The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978;80:623-30.
8. Rees A, Shoulders CC, Stocks J, Galton DJ, Baralle FE. DNA polymorphism adjacent to human apoprotein A-1 gene: relation to hypertriglyceridaemia. *Lancet*. 1983;1:444-6.
9. Aron L, Jones S, Fielding CJ. Human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Characterization of cofactor-dependent phospholipase activity. *J Biol Chem*. 1978;253:7220-6.
10. Williams DL, Connelly MA, Temel RE, Swarnakar S, Phillips MC, de la Llera-Moya M, Rothblat GH. Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:329-39.

11. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*. 1991;353:265-7.
12. Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:9607-11.
13. Paszty C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 1994;94:899-903.
14. Williamson R, Lee D, Hagaman J, Maeda N. Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:7134-8.
15. Parks JS, Li H, Gebre AK, Smith TL, Maeda N. Effect of apolipoprotein A-I deficiency on lecithin:cholesterol acyltransferase activation in mouse plasma. *J Lipid Res*. 1995;36:349-55.
16. Li H, Reddick RL, Maeda N. Lack of apoA-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1814-21.
17. Hughes SD, Verstuyft J, Rubin EM. HDL deficiency in genetically engineered mice requires elevated LDL to accelerate atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1725-9.
18. Plump AS, Erickson SK, Weng W, Partin JS, Breslow JL, Williams DL. Apolipoprotein A-I is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production. *J Clin Invest*. 1996;97:2660-71.
19. Martin-Campos JM, Escola-Gil JC, Ribas V, Blanco-Vaca F. Apolipoprotein A-II, genetic variation on chromosome 1q21-q24, and disease susceptibility. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15:247-53.
20. Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC, Martin-Campos JM, Julve J. Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein. *J Lipid Res*. 2001;42:1727-39.

21. Weisgraber KH, Mahley RW. Apoprotein (E--A-II) complex of human plasma lipoproteins. I. Characterization of this mixed disulfide and its identification in a high density lipoprotein subfraction. *J Biol Chem.* 1978;253:6281-8.
22. Blanco-Vaca F, Via DP, Yang CY, Massey JB, Pownall HJ. Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 1992;33:1785-96.
23. Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res.* 1988;29:245-71.
24. Scanu AM, Lagocki P, Chung J. Effect of apolipoprotein A-II on the structure of high-density lipoproteins: relationship to the activity of lecithin:cholesterol acyl transferase in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1980;348:160-73.
25. Ikewaki K, Zech LA, Kindt M, Brewer HB, Jr., Rader DJ. Apolipoprotein A-II production rate is a major factor regulating the distribution of apolipoprotein A-I among HDL subclasses LpA-I and LpA-I:A-II in normolipidemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:306-12.
26. Mowri HO, Patsch JR, Gotto AM, Jr., Patsch W. Apolipoprotein A-II influences the substrate properties of human HDL2 and HDL3 for hepatic lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:755-62.
27. Zhong S, Goldberg IJ, Bruce C, Rubin E, Breslow JL, Tall A. Human ApoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice. *J Clin Invest.* 1994;94:2457-67.
28. Lagrost L, Persegol L, Lallemand C, Gambert P. Influence of apolipoprotein composition of high density lipoprotein particles on cholesteryl ester transfer protein activity. Particles containing various proportions of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem.* 1994;269:3189-97.
29. Lagrost L, Dengremont C, Athias A, de Geitere C, Fruchart JC, Lallemand C, Gambert P, Castro G. Modulation of cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells by the apolipoprotein content of high density lipoprotein

- particles. Particles containing various proportions of apolipoproteins A-I and A-II. *J Biol Chem.* 1995;270:13004-9.
30. Fruchart JC, Ailhaud G. Apolipoprotein A-containing lipoprotein particles: physiological role, quantification, and clinical significance. *Clin Chem.* 1992;38:793-7.
 31. Forte TM, Bielicki JK, Goth-Goldstein R, Selmek J, McCall MR. Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT. *J Lipid Res.* 1995;36:148-57.
 32. Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Assmann G. Cholesterol efflux, cholesterol esterification, and cholesteryl ester transfer by LpA-I and LpA-I/A-II in native plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1412-8.
 33. Marzal-Casacuberta A, Blanco-Vaca F, Ishida BY, Julve-Gil J, Shen J, Calvet-Marquez S, Gonzalez-Sastre F, Chan L. Functional lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and high density lipoprotein deficiency in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *J Biol Chem.* 1996;271:6720-8.
 34. Hedrick CC, Castellani LW, Warden CH, Puppione DL, Lusis AJ. Influence of mouse apolipoprotein A-II on plasma lipoproteins in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1993;268:20676-82.
 35. Castellani LW, Navab M, Van Lenten BJ, Hedrick CC, Hama SY, Goto AM, Fogelman AM, Lusis AJ. Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J Clin Invest.* 1997;100:464-74.
 36. Warden CH, Hedrick CC, Qiao JH, Castellani LW, Lusis AJ. Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science.* 1993;261:469-72.
 37. Doolittle MH, LeBoeuf RC, Warden CH, Bee LM, Lusis AJ. A polymorphism affecting apolipoprotein A-II translational efficiency determines high density lipoprotein size and composition. *J Biol Chem.* 1990;265:16380-8.

38. Mehrabian M, Qiao JH, Hyman R, Ruddle D, Laughton C, Lusis AJ. Influence of the apoA-II gene locus on HDL levels and fatty streak development in mice. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1-10.
39. Schultz JR, Gong EL, McCall MR, Nichols AV, Clift SM, Rubin EM. Expression of human apolipoprotein A-II and its effect on high density lipoproteins in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1992;267:21630-6.
40. Julve-Gil J, Ruiz-Perez E, Casaroli-Marano RP, Marzal-Casacuberta A, Escola-Gil JC, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F. Free cholesterol deposition in the cornea of human apolipoprotein A-II transgenic mice with functional lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. *Metabolism.* 1999;48:415-21.
41. Escola-Gil JC, Julve J, Marzal-Casacuberta A, Ordonez-Llanos J, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F. Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2000;41:1328-38.
42. Escola-Gil JC, Julve J, Marzal-Casacuberta A, Ordonez-Llanos J, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F. ApoA-II expression in CETP transgenic mice increases VLDL production and impairs VLDL clearance. *J Lipid Res.* 2001;42:241-8.
43. Schultz JR, Verstuyft JG, Gong EL, Nichols AV, Rubin EM. Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice. *Nature.* 1993;365:762-4.
44. Boisfer E, Stengel D, Pastier D, Laplaud PM, Dousset N, Ninio E, Kalopissis AD. Antioxidant properties of HDL in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *J Lipid Res.* 2002;43:732-41.
45. Weng W, Breslow JL. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14788-94.

46. McCombs RJ, Marcadis DE, Ellis J, Weinberg RB. Attenuated hypercholesterolemic response to a high-cholesterol diet in subjects heterozygous for the apolipoprotein A-IV-2 allele. *N Engl J Med.* 1994;331:706-10.
47. Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem.* 1990;265:4266-72.
48. Ordovas JM, Cassidy DK, Civeira F, Bisgaier CL, Schaefer EJ. Familial apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J Biol Chem.* 1989;264:16339-42.
49. von Eckardstein A, Huang Y, Wu S, Sarmadi AS, Schwarz S, Steinmetz A, Assmann G. Lipoproteins containing apolipoprotein A-IV but not apolipoprotein A-I take up and esterify cell-derived cholesterol in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1755-63.
50. Duverger N, Tremp G, Caillaud JM, Emmanuel F, Castro G, Fruchart JC, Steinmetz A, Deneffe P. Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV. *Science.* 1996;273:966-8.
51. van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, Groen AK, Chamuleau RA. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;295:1156-9.
52. van Dijk KW, Rensen PC, Voshol PJ, Havekes LM. The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism? *Curr Opin Lipidol.* 2004;15:239-46.
53. Pennacchio LA, Rubin EM. Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:529-34.
54. Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Maeda N, Assmann G. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on

- electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:1834-8.
55. Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Assmann G. Effects of the apolipoprotein E polymorphism on uptake and transfer of cell-derived cholesterol in plasma. *J Clin Invest*. 1995;96:2693-701.
56. Arai T, Rinninger F, Varban L, Fairchild-Huntress V, Liang CP, Chen W, Seo T, Deckelbaum R, Huszar D, Tall AR. Decreased selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in apolipoprotein E knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12050-5.
57. de Silva HV, Harmony JA, Stuart WD, Gil CM, Robbins J. Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry*. 1990;29:5380-9.
58. de Silva HV, Stuart WD, Duvic CR, Wetterau JR, Ray MJ, Ferguson DG, Albers HW, Smith WR, Harmony JA. A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1990;265:13240-7.
59. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, Brennan ML, Lusis AJ, Fogelman AM, La Du BN. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest*. 1997;99:2005-19.
60. Kounnas MZ, Loukinova EB, Stefansson S, Harmony JA, Brewer BH, Strickland DK, Argraves WS. Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin. *J Biol Chem*. 1995;270:13070-5.
61. Balbin M, Freije JM, Fueyo A, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem J*. 1990;271:803-7.
62. Morais Cabral JH, Atkins GL, Sanchez LM, Lopez-Boado YS, Lopez-Otin C, Sawyer L. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett*. 1995;366:53-6.

63. de Beer MC, Yuan T, Kindy MS, Asztalos BF, Roheim PS, de Beer FC. Characterization of constitutive human serum amyloid A protein (SAA4) as an apolipoprotein. *J Lipid Res.* 1995;36:526-34.
64. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995;96:2758-67.
65. Hosoai H, Webb NR, Glick JM, Tietge UJ, Purdom MS, de Beer FC, Rader DJ. Expression of serum amyloid A protein in the absence of the acute phase response does not reduce HDL cholesterol or apoA-I levels in human apoA-I transgenic mice. *J Lipid Res.* 1999;40:648-53.
66. Patsch JR, Prasad S, Gotto AM, Jr., Patsch W. High density lipoprotein2. Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *J Clin Invest.* 1987;80:341-7.
67. Patsch J. Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels. *Eur Heart J.* 1998;19 Suppl H:H2-6.
68. Patsch JR, Gotto AM, Jr., Olivecrona T, Eisenberg S. Formation of high density lipoprotein2-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:4519-23.
69. Applebaum-Bowden D. Lipases and lecithin: cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 1995;6:130-5.
70. Olivecrona G, Olivecrona T. Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1995;6:291-305.
71. Clay MA, Barter PJ. Formation of new HDL particles from lipid-free apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* 1996;37:1722-32.
72. Barrans A, Jaspard B, Barbaras R, Chap H, Perret B, Collet X. Pre-beta HDL: structure and metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1300:73-85.
73. Weng W, Brandenburg NA, Zhong S, Halkias J, Wu L, Jiang XC, Tall A, Breslow JL. ApoA-II maintains HDL levels in part by inhibition of hepatic

- lipase. Studies In apoA-II and hepatic lipase double knockout mice. *J Lipid Res.* 1999;40:1064-70.
74. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet.* 1999;21:424-8.
75. Yang CY, Manoogian D, Pao Q, Lee FS, Knapp RD, Gotto AM, Jr., Pownall HJ. Lecithin:cholesterol acyltransferase. Functional regions and a structural model of the enzyme. *J Biol Chem.* 1987;262:3086-91.
76. Qu SJ, Fan HZ, Blanco-Vaca F, Pownall HJ. Effects of site-directed mutagenesis on the serine residues of human lecithin:cholesterol acyltransferase. *Lipids.* 1994;29:803-9.
77. Sviridov D, Hoang A, Sawyer WH, Fidge NH. Identification of a sequence of apolipoprotein A-I associated with the activation of Lecithin:Cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem.* 2000;275:19707-12.
78. Huang Y, von Eckardstein A, Assmann G. Cell-derived unesterified cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:445-58.
79. Berard AM, Foger B, Remaley A, Shamburek R, Vaisman BL, Talley G, Paigen B, Hoyt RF, Jr., Marcovina S, Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesteryl acyltransferase. *Nat Med.* 1997;3:744-9.
80. Lambert G, Sakai N, Vaisman BL, Neufeld EB, Marteyn B, Chan CC, Paigen B, Lupia E, Thomas A, Striker LJ, Blanchette-Mackie J, Csako G, Brady JN, Costello R, Striker GE, Remaley AT, Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice. *J Biol Chem.* 2001;276:15090-8.
81. Forte TM, Oda MN, Knoff L, Frei B, Suh J, Harmony JA, Stuart WD, Rubin EM, Ng DS. Targeted disruption of the murine lecithin:cholesterol acyltransferase gene is associated with reductions in plasma paraoxonase

- and platelet-activating factor acetylhydrolase activities but not in apolipoprotein J concentration. *J Lipid Res.* 1999;40:1276-83.
82. Vohl MC, Neville TA, Kumarathasan R, Braschi S, Sparks DL. A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry.* 1999;38:5976-81.
83. Murakami Y, Kamiyama S, Howlader ZH, Yamato T, Komai M, Furukawa Y. Lecithin: cholesterol acyltransferase is insufficient to prevent oxidative modification of low-density lipoprotein. *J Biochem (Tokyo).* 2002;131:17-9.
84. Barter P. CETP and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2029-31.
85. Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, Mancuso JP, Rader DJ. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med.* 2004;350:1505-15.
86. Qu SJ, Fan HZ, Kilinc C, Pownall HJ. Role of cysteine residues in human plasma phospholipid transfer protein. *J Protein Chem.* 1999;18:193-8.
87. Huuskonen J, Jauhiainen M, Ehnholm C, Olkkonen VM. Biosynthesis and secretion of human plasma phospholipid transfer protein. *J Lipid Res.* 1998;39:2021-30.
88. Pussinen PJ, Jauhiainen M, Metso J, Pyle LE, Marcel YL, Fidge NH, Ehnholm C. Binding of phospholipid transfer protein (PLTP) to apolipoproteins A-I and A-II: location of a PLTP binding domain in the amino terminal region of apoA-I. *J Lipid Res.* 1998;39:152-61.
89. von Eckardstein A, Jauhiainen M, Huang Y, Metso J, Langer C, Pussinen P, Wu S, Ehnholm C, Assmann G. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1301:255-62.
90. Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gambert P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9:203-9.

91. Jiang XC, Bruce C, Mar J, Lin M, Ji Y, Francone OL, Tall AR. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest.* 1999;103:907-14.
92. Qin S, Kawano K, Bruce C, Lin M, Bisgaier C, Tall AR, Jiang X. Phospholipid transfer protein gene knock-out mice have low high density lipoprotein levels, due to hypercatabolism, and accumulate apoA-IV-rich lamellar lipoproteins. *J Lipid Res.* 2000;41:269-76.
93. Ehnholm S, van Dijk KW, van 't Hof B, van der Zee A, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Hofker M, Havekes L, Ehnholm C. Adenovirus mediated overexpression of human phospholipid transfer protein alters plasma HDL levels in mice. *J Lipid Res.* 1998;39:1248-53.
94. Leal Luna A, Blanco Vaca F, Gomez Gerique JA, Perez Gallofre A, Franco Peral M, Fabiani Romero F. [Tangier disease: study of the first case in Spain]. *Med Clin (Barc).* 1989;93:301-3.
95. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* 1999;22:352-5.
96. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Hayden MR, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* 1999;22:336-45.
97. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 1999;22:347-51.

98. Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, Gotz A, Chambenoit O, Diederich W, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet.* 2000;24:192-6.
99. McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4245-50.
100. Broccardo C, Luciani M, Chimini G. The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1461:395-404.
101. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest.* 1999;104:R25-31.
102. Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:817-22.
103. Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev.* 2003;24:357-87.
104. Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem.* 2001;276:25287-93.
105. Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1732-8.

106. Mardones P, Strobel P, Miranda S, Leighton F, Quinones V, Amigo L, Rozowski J, Krieger M, Rigotti A. Alpha-tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. *J Nutr.* 2002;132:443-9.
107. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 1997;272:20982-5.
108. Eckhardt ER, Cai L, Sun B, Webb NR, van der Westhuyzen DR. High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *J Biol Chem.* 2004;279:14372-81.
109. La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med.* 1996;2:1186-7.
110. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry.* 1994;33:832-9.
111. Kuo CL, La Du BN. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab Dispos.* 1998;26:653-60.
112. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum Paraoxonase/ Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids : apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2214-25.
113. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995;96:2882-91.
114. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J.* 2001;354:1-7.

115. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraonase activities: selective action of human paraonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1617-24.
116. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:284-7.
117. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2000;275:17527-35.
118. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraonase. *J Clin Invest.* 1998;101:1581-90.
119. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2744-52.
120. Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih DM, Aviram M. Paraonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:774-84.
121. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraonase 2 activity is increased whereas cellular paraonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:468-74.

122. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusic AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:542-7.
123. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem.* 2000;275:33435-42.
124. Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SP, Vaitkus D, McIntyre TM, Gray PW, Young SG, Prescott SM. Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1999;274:7018-24.
125. Stremmler KE, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem.* 1991;266:11095-103.
126. Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995;95:774-82.
127. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:1825-35.
128. Chen N, Liu Y, Greiner CD, Holtzman JL. Physiologic concentrations of homocysteine inhibit the human plasma GSH peroxidase that reduces organic hydroperoxides. *J Lab Clin Med.* 2000;136:58-65.
129. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res.* 1999;40:781-96.
130. Czarnecka H, Yokoyama S. Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange. *J Biol Chem.* 1996;271:2023-8.

131. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 1995;36:211-28.
132. de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Connelly MA, Kellner-Weibel G, Sakr SW, Phillips MC, Williams DL. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J Lipid Res.* 1999;40:575-80.
133. Takahashi Y, Smith JD. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:11358-63.
134. Haghpasand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest.* 2001;108:1315-20.
135. van Eck M, Bos IS, Kaminski WE, Orso E, Rothe G, Twisk J, Bottcher A, Van Amersfoort ES, Christiansen-Weber TA, Fung-Leung WP, Van Berkel TJ, Schmitz G. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:6298-303.
136. Camarota LM, Chapman JM, Hui DY, Howles PN. Carboxyl ester lipase cofractionates with scavenger receptor BI in hepatocyte lipid rafts and enhances selective uptake and hydrolysis of cholesteryl esters from HDL3. *J Biol Chem.* 2004;279:27599-606.
137. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis.* 1995;115:243-53.
138. Banka CL. High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipidol.* 1996;7:139-42.
139. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004;95:764-72.
140. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000;41:1481-94.

141. Reddy ST, Hama S, Ng C, Grijalva V, Navab M, Fogelman AM. ATP-binding cassette transporter 1 participates in LDL oxidation by artery wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1877-83.
142. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000;41:1495-508.
143. Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, Fogelman AM, Lusis AJ. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11:155-61.
144. Garner B, Waldeck AR, Witting PK, Rye KA, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem.* 1998;273:6088-95.
145. Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP, Hama S, Navab M, Fogelman AM. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. *Circulation.* 2001;103:2283-8.
146. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis.* 1998;139:307-15.
147. Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:10316-20.
148. Sattler W, Stocker R. Greater selective uptake by Hep G2 cells of high-density lipoprotein cholesteryl ester hydroperoxides than of unoxidized cholesteryl esters. *Biochem J.* 1993;294 (Pt 3):771-8.
149. Julve J, Escola-Gil JC, Marzal-Casacuberta A, Ordonez-Llanos J, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F. Increased production of very-low-density lipoproteins in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II and fed with a high-fat diet. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1488:233-44.

150. Escola-Gil JC, Marzal-Casacuberta A, Julve-Gil J, Ishida BY, Ordonez-Llanos J, Chan L, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F. Human apolipoprotein A-II is a pro-atherogenic molecule when it is expressed in transgenic mice at a level similar to that in humans: evidence of a potentially relevant species-specific interaction with diet. *J Lipid Res.* 1998;39:457-62.
151. Palinski W, Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Butler SW, Socher SA, Parthasarathy S, Curtiss LK, Witztum JL. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis.* 1990;10:325-35.
152. Rosenfeld ME, Palinski W, Yla-Herttuala S, Butler S, Witztum JL. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis.* 1990;10:336-49.
153. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
154. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955;34:1345-53.
155. Rumsey SC, Galeano NF, Arad Y, Deckelbaum RJ. Cryopreservation with sucrose maintains normal physical and biological properties of human plasma low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1992;33:1551-61.
156. Chung BH, Segrest JP, Ray MJ, Brunzell JD, Hokanson JE, Krauss RM, Beaudrie K, Cone JT. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol.* 1986;128:181-209.
157. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos.* 1991;19:100-6.
158. Connelly PW, Maguire GF, Draganov DI. Separation and quantitative recovery of mouse serum arylesterase and carboxylesterase activity by size-exclusion chromatography and ultracentrifugation. *J Lipid Res.* 2004.

159. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*. 1984;4:357-64.
160. Sanchez-Quesada JL, Ortega H, Payes-Romero A, Serrat-Serrat J, Gonzalez-Sastre F, Lasuncion MA, Ordonez-Llanos J. LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. *Atherosclerosis*. 1997;132:207-13.
161. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*. 1989;6:67-75.
162. Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, Fogelman AM. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res*. 2001;42:1308-17.
163. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290:921-7.
164. Schwarz M, Davis DL, Vick BR, Russell DW. Genetic analysis of intestinal cholesterol absorption in inbred mice. *J Lipid Res*. 2001;42:1801-11.
165. Turley SD, Daggy BP, Dietschy JM. Psyllium augments the cholesterol-lowering action of cholestyramine in hamsters by enhancing sterol loss from the liver. *Gastroenterology*. 1994;107:444-52.
166. Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*. 2003;108:661-3.
167. Serrat-Serrat J, Ordonez-Llanos J, Serra-Grima R, Gomez-Gerique JA, Pellicer-Thoma E, Payes-Romero A, Gonzalez-Sastre F. Marathon runners presented lower serum cholesteryl ester transfer activity than sedentary subjects. *Atherosclerosis*. 1993;101:43-9.

168. Julve J, Escola-Gil JC, Ribas V, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J, Sanchez-Quesada JL, Blanco-Vaca F. Mechanisms of HDL deficiency in mice overexpressing human apoA-II. *J Lipid Res.* 2002;43:1734-42.
169. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ, 2nd. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:9383-7.
170. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr.* 1991;53:314S-321S.
171. Wieland E, Parthasarathy S, Steinberg D. Peroxidase-dependent metal-independent oxidation of low density lipoprotein in vitro: a model for in vivo oxidation? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:5929-33.
172. Yoshikawa M, Sakuma N, Hibino T, Sato T, Fujinami T. HDL3 exerts more powerful anti-oxidative, protective effects against copper-catalyzed LDL oxidation than HDL2. *Clin Biochem.* 1997;30:221-5.
173. Gowri MS, Van der Westhuyzen DR, Bridges SR, Anderson JW. Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may be due to the abnormal composition of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2226-33.
174. Parthasarathy S, Auye N, Santanam N. Implications of lag time concept in the oxidation of LDL. *Free Radic Res.* 1998;28:583-91.
175. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:892-904.
176. Nguyen SD, Sok DE. Preferential inhibition of paraoxonase activity of human paraoxonase 1 by negatively charged lipids. *J Lipid Res.* 2004;45:2211-20.
177. Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, Garber DW, Chaddha M, Hough G, Lallone R, Fogelman AM. Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces

- atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation*. 2002;105:290-2.
178. Hashinotsume M, Higashino K, Hada T, Yamamura Y. Purification and enzymatic properties of rat serum carboxylesterase. *J Biochem (Tokyo)*. 1978;84:1325-33.
179. Xie M, Yang D, Liu L, Xue B, Yan B. Human and rodent carboxylesterases: immunorelatedness, overlapping substrate specificity, differential sensitivity to serine enzyme inhibitors, and tumor-related expression. *Drug Metab Dispos*. 2002;30:541-7.
180. Cabana VG, Reardon CA, Feng N, Neath S, Lukens J, Getz GS. Serum paraoxonase: effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response. *J Lipid Res*. 2003;44:780-92.
181. Noto H, Hashimoto Y, Satoh H, Hara M, Iso-o N, Togo M, Kimura S, Tsukamoto K. Exclusive association of paraoxonase 1 with high-density lipoprotein particles in apolipoprotein A-I deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;289:395-401.
182. Oda MN, Bielicki JK, Berger T, Forte TM. Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity. *Biochemistry*. 2001;40:1710-8.
183. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem*. 1993;211:871-9.
184. Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. Distribution Spectrum of Paraoxonase Activity in HDL Fractions. *Clin Chem*. 2004;50:2309-15.
185. Quarck R, De Geest B, Stengel D, Mertens A, Lox M, Theilmeier G, Michiels C, Raes M, Bult H, Collen D, Van Veldhoven P, Ninio E, Holvoet P. Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces

- spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2001;103:2495-500.
186. Holvoet P, Peeters K, Lund-Katz S, Mertens A, Verhamme P, Quarck R, Stengel D, Lox M, Deridder E, Bernar H, Nickel M, Theilmeier G, Ninio E, Phillips MC. Arg123-Tyr166 domain of human ApoA-I is critical for HDL-mediated inhibition of macrophage homing and early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1977-83.
187. Shih DM, Gu L, Hama S, Xia YR, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*. 1996;97:1630-9.
188. Osono Y, Woollett LA, Marotti KR, Melchior GW, Dietschy JM. Centripetal cholesterol flux from extrahepatic organs to the liver is independent of the concentration of high density lipoprotein-cholesterol in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:4114-9.
189. Jolley CD, Woollett LA, Turley SD, Dietschy JM. Centripetal cholesterol flux to the liver is dictated by events in the peripheral organs and not by the plasma high density lipoprotein or apolipoprotein A-I concentration. *J Lipid Res*. 1998;39:2143-9.
190. Alam K, Meidell RS, Spady DK. Effect of up-regulating individual steps in the reverse cholesterol transport pathway on reverse cholesterol transport in normolipidemic mice. *J Biol Chem*. 2001;276:15641-9.
191. Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC, Clavey V. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;164:1-13.
192. Kalopissis AD, Pastier D, Chambaz J. Apolipoprotein A-II: beyond genetic associations with lipid disorders and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:165-72.
193. Fournier N, Cogy A, Atger V, Pastier D, Goudouneche D, Nicoletti A, Moatti N, Chambaz J, Paul JL, Kalopissis AD. Opposite effects of plasma from human apolipoprotein A-II transgenic mice on cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:638-43.

194. Tailleux A, Bouly M, Luc G, Castro G, Caillaud JM, Hennuyer N, Poulain P, Fruchart JC, Duverger N, Fievet C. Decreased susceptibility to diet-induced atherosclerosis in human apolipoprotein A-II transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2453-8.
195. Rinninger F, Brundert M, Budzinski RM, Fruchart JC, Greten H, Castro GR. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates a higher selective cholesteryl ester uptake from LpA-I compared with LpA-I:A-II lipoprotein particles. *Atherosclerosis.* 2003;166:31-40.
196. de Beer MC, Castellani LW, Cai L, Stromberg AJ, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. ApoA-II modulates the association of HDL with class B scavenger receptors SR-BI and CD36. *J Lipid Res.* 2004;45:706-15.
197. Julve-Gil J. Metabolisme de les lipoproteïnes en ratolins transgènics de l'apolipoproteïna A-II humana. In: *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.* Barcelona: Universitat de Barcelona; 2000:218.
198. Nishida HI, Nishida T. Phospholipid transfer protein mediates transfer of not only phosphatidylcholine but also cholesterol from phosphatidylcholine-cholesterol vesicles to high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1997;272:6959-64.
199. Stein O, Dabach Y, Hollander G, Ben-Naim M, Halperin G, Stein Y. High levels of human apolipoprotein A-I and high density lipoproteins in transgenic mice do not enhance efflux of cholesterol from a depot of injected lipoproteins. Relevance to regression of atherosclerosis? *Atherosclerosis.* 1999;144:367-74.
200. Blum CB, Dell RB, Palmer RH, Ramakrishnan R, Sepowitz AH, Goodman DS. Relationship of the parameters of body cholesterol metabolism with plasma levels of HDL cholesterol and the major HDL apoproteins. *J Lipid Res.* 1985;26:1079-88.
201. Assmann G, Gotto AM, Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III8-14.

-
202. Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:720-7.
203. Ribas V, Sanchez-Quesada JL, Anton R, Camacho M, Julve J, Escola-Gil JC, Vila L, Ordonez-Llanos J, Blanco-Vaca F. Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res.* 2004;95:789-97.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado gracias al proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia SAF 99-0104, y a los proyectos de Fondo de Investigación Sanitaria 01-3083, G03-181 y C03-08. Durante el desarrollo de este estudio he sido becario predoctoral del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia y Tecnología (referencia PN 1999-00305) y becario de investigación del Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

El desarrollo de la presente tesis no es sólo el trabajo del autor, sino que es el resultado de un trabajo de equipo en el que todos sus miembros aportan elementos que son importantes en la realización del estudio. Por ello me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de una manera u otra han hecho posible esta tesis.

En primer lugar agradezco sinceramente la oportunidad que me brindó el Dr. Francisco Blanco para incorporarme en su grupo de investigación. La orientación y consejos han sido de gran ayuda en mi formación, en la interpretación de resultados, en la planificación... que han dado como resultado esta tesis, junto con otros trabajos.

Al Dr. José Luis Sánchez, codirector de esta tesis y gran especialista en el estudio de la oxidación de lipoproteínas, debo agradecerle la ayuda técnica y teórica que adquiría en nuestras discusiones sobre los resultados que día a día obteníamos en el laboratorio.

Igualmente agradezco al Dr. Jordi Ordóñez, como tutor, el cual también ha participado en estos estudios y al Dr. Francesc González Sastre como jefe del Servicio de Bioquímica por su apoyo al grupo de investigación.

Durante el período de desarrollo de este estudio se han realizado colaboraciones con otros grupos, tanto del mismo hospital como de otros centros de investigación y todos ellos merecen nuestro agradecimiento.

Entre ellos está el grupo del Dr. Luís Vila de Mediadores de la Inflamación, en cuyo laboratorio se determinaron los HODE, llevado a cabo por la Dra. Rosa Antón y la Dra. Mercedes Camacho realizó algunos de los ensayos celulares.

Asimismo agradecemos al grupo del Dr. Jorge Joven, del Institut de Recerca en Ciències de la Salut de l'Hospital Universitari de Sant Joan (Reus), y a Mònica Tous, con los cuales hemos realizado interesantes estudios sobre inflamación y arteriosclerosis.

Con el grupo de Dr. Joan Carles Laguna de la Facultad de Farmacia de la UB y con la Dra. Nuria Roglans estudiamos los mecanismos de la hiperlipemia de los ratones transgénicos y la posible implicación de los PPAR, temas en los cuales ellos son auténticos expertos.

En las dos estancias en los Estados Unidos que he realizado quiero destacar el gran apoyo y amabilidad con la que fui recibido. El Dr. La Du, de la University of Michigan, me brindó la oportunidad de estar en su laboratorio, y el Dr. Dragomir Draganov estuvo en todo momento ayudándome y enseñándome todo lo necesario, tanto en el laboratorio como en mi adaptación a un país extranjero. En la University of California Los Angeles, debo destacar la acogida y la atención que recibí del Dr. Mohamad Navab, y de su laboratorio, Naeimeh Kamrampour, Shirin Rahmani y Susan Hama. Gracias a ellos y a otras personas, estas estancias fueron muy positivas, logrando unos pasos de gigante en mi formación tanto científica como personal.

Mis compañeros en el laboratorio de Lípidos del Servei de Bioquímica del Hospital de Sant Pau merecen una mención destacada. Especialmente Joan Carles Escolà, Josep Julve y Jesús Martín fueron mis maestros a pie de laboratorio los primeros años y excelentes compañeros y amigos, de los cuales siempre he tenido apoyo y constructivas discusiones, tanto científicas como cotidianas. Los

compañeros Noemí Rotllan, que desarrolló el método de transporte reverso de macrófagos en sus modelos experimentales, Laura Calpe, que inició los estudios de absorción intestinal de colesterol entre otros, y que junto con Carmen Trocho, Xevi Palomer, y Gloria Rodríguez hemos compartido largas pero agradables jornadas en el laboratorio y en el estabulario. Sonia Benítez, siempre preocupada por la nutrición de nuestro grupo y Cristina Bancells, las cuales siempre están dispuestas a ayudar en lo que haga falta y aportan buen humor en todo lo que hacen. A Carlos Díaz, peruano, japonés y ahora catalán, y una persona absolutamente admirable, debo agradecerle los buenos momentos que nos ha hecho pasar y lo que hemos aprendido todos de él. Con un equipo humano como éste es un auténtico placer trabajar día a día.

Quiero agradecer al equipo de Rutina con los que trabajamos codo con codo, ya que siempre hemos tenido una relación excelente y la coordinación con ellos ha sido por lo general, muy buena. Cabe mencionar a Rosa Arcelus, responsable del HPLC donde se midieron las vitaminas antioxidantes; Rosa Bonet encargada de mantener en buen estado el Hitachi 911, aparato muy valioso en nuestros estudios, Oscar Jorba, también usuario del Hitachi 911 y especialista en subfracciones de la LDL; Pepi Bascón, apoyo logístico absolutamente imprescindible para todos, Carmen Mayoral, Agustina, Rosa Roig, Edgar, Ana Belén, Ester Alonso y Paco Rico que nos han ayudado en todo.

Por último, debo agradecer a mi familia que desde el principio ha apoyado y aconsejado. A Laia debo hacerle partícipe de este trabajo, ya que ha estado a mi lado en todo con una gran comprensión, siendo para mí el mejor apoyo, no solo en esta tesis sino también en mi vida.

Por todo ello, a todos, muchas gracias.