

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**AVALUACIÓ DEL TRANSPORT REVERS DE
COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS EN
RATOLINS AMB MODIFICACIONS GENÈTIQUES
EN PROTEÏNES QUE INTERVENEN A
L'ESTRUCTURA I METABOLISME DE L'HDL:
APOA-II, CETP, ABCA-1 I ABCG5-G8**

Noemi Rotllan Vila

Barcelona, Juliol de 2008

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Memòria per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.
Programa de Doctorat de Bioquímica Clínica i Patologia Molecular del Departament de
Bioquímica i Biologia Molecular del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Universitat Autònoma de Barcelona, bienni 2003-2005

**AVALUACIÓ DEL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL
ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS EN RATOLINS AMB
MODIFICACIONS GENÈTIQUES EN PROTEÏNES QUE
INTERVENEN A L'ESTRUCTURA I METABOLISME DE L'HDL:
APOA-II, CETP, ABCA-1 I ABCG5-G8**

Tesi Doctoral que presenta Noemi Rotllan Vila, dirigida pels directors Dr. Francisco Blanco Vaca i Dr. Joan Carles Escolà i Gil i com a tutora la Dra. Gómez Foix

Els Directors de la Tesi

La Tutora

Dr. Francisco Blanco Vaca i Dr. Joan Carles Escolà i Gil

**Dra. Anna M^a
Gómez Foix**

La doctoranda

Noemi Rotllan Vila

ÍNDEX

<u>INTRODUCCIÓ</u>	<u>7</u>
1. ESTRUCTURA I CARACTERÍSTIQUES DE LES LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT (HDL)	<u>9</u>
2. METABOLISME I FUNCIÓ DE LES HDL	<u>10</u>
2.1 BIOSÍNTESI I CATABOLISME DE LES HDL COLESTEROL	<u>10</u>
2.2 MECANISMES DEL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL	<u>11</u>
2.3 PROTEÏNES IMPLICADES EN EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL	<u>14</u>
2.3.1. APOA-I	<u>14</u>
2.3.2. APOA-II	<u>17</u>
2.3.3. CETP	<u>18</u>
2.3.4. LCAT	<u>19</u>
2.3.5. SR-BI	<u>20</u>
2.3.6. ABC	<u>22</u>
2.3.6.1. ABCA1	<u>23</u>
2.3.6.2. ABCG1	<u>24</u>
2.3.6.1. ABCG5 I ABCG8	<u>25</u>
2.4 PROPIETATS ANTIOXIDANTS I ANTIINFLAMÀTORIES DE LES HDL	<u>25</u>
2.4.1. MECANISMES	<u>25</u>
2.4.2. APOA-I	<u>28</u>
2.4.3. APOA-II	<u>30</u>
2.4.4. PON-1	<u>31</u>

2.4.5. PAF-AH	32
2.4.6. CETP	34
<u>HIPÒTESI I OBJECTIUS</u>	37
<u>PUBLICACIONS</u>	43
P.1 OVEREXPRESSION OF HUMAN APOLIPOPROTEIN A-II IN TRANSGENIC MICE DOES NOT IMPAIR MACROPHAGE-SPECIFIC REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT IN VIVO	45
P.2 DIRECT EVIDENCE IN VIVO OF IMPAIRED MACROPHAGE-SPECIFIC REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT IN ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER A1-DEFICIENT MICE	55
P.3 CETP ACTIVITY VARIATION IN MICE DOES NOT AFFECT TWO MAJOR HDL ANTIATHEROGENIC PROPERTIES: MACROPHAGE-SPECIFIC REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT AND LDL ANTIOXIDANT PROTECTION	63
P.4 LIVER X RECEPTOR-MEDIATED ACTIVATION OF REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT FROM MACROPHAGES TO FECES IN VIVO REQUIRES ATP-BINDING CASSETTE (ABC) G5/G8	81
<u>RESUM GLOBAL</u>	95
R.1 RESULTATS I DISCUSSIÓ	97
R.1.1. EFECTES DE L’APOA-II HUMANA SOBRE EL PERFIL LIPOPROTEIC I L’EXCRECIÓ FECAL DE LÍPIDS	97
R.1.2. EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS EN RATOLINS TRANSGÈNICS D’APOA-II ALIMENTATS AMB UNA DIETA DE MANTENIMENT	97

R.1.3. EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS EN RATOLINS TRANSGÈNICS D'APOA-II ALIMENTATS AMB UNA DIETA RICA EN GREIXOS	98
R.2 RESULTATS I DISCUSSIÓ	101
R.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ	103
R.3.1. EFECTE DE LA CETP SOBRE EL PERFIL LIPOPORTIEC I L'EXCRECIÓ FECAL DE LÍPIDS	103
R.3.2. L'EXPRESSIÓ DE CETP NO ALTERA EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS EN RATOLINS TRANSGÈNICS ALIMENTATS AMB UNA DIETA DE MANTENIMENT O AMB UNA DIETA RICA EN GREIXOS	104
R.3.3. L'EXPRESSIÓ DE CETP NO ALTERA LA CAPACITAT DE LES HDL D'INHIBIR LA MODIFICACIÓ OXIDATIVA DE L'LDL	106
R.3.4. ACTIVITAT EN PLASMA D'ENZIMS ASSOCIATS A L'HDL INVOLUCRATS EN LA PROTECCIÓ ANTIOXIDATIVA DE LDL	106
R.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ	108
R.4.1. LA DEFICIÈNCIA DEL TRANSPORTADOR ABCG5/G8 NO ALTERA EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL DES DE MACRÒFAGS A FEMTES EN RATOLINS	108
R.4.2. EL TRANSPORTADOR ABCG5/G8 ÉS NECESSARI PER LA INDUCCIÓ DEL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS A TRAVÉS DE L'ACTIVACIÓ DE LXR	108
R.4.3 EFECTES DEL AGONISTA DE LXR EN L'INTESTÍ I EN FETGE SOBRE L'EXPRESSIÓ DE GENS RELACIONATS AMB EL TRANSPORT	

REVERS DE COLESTEROL EN RATOLINS G5/G8 ^{+/+} I G5G8 ^{-/-}	110
---	-----

CONCLUSIONS	113
--------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	117
---------------------	------------

I. INTRODUCCIÓ

1. ESTRUCTURA I CARACTERÍSTIQUES DE LES LIPOPROTEÏNES D'ALTA DENSITAT(HDL)

Les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) constitueixen una de les famílies lipoproteiques quantitativament predominant en plasma que conté aproximadament la mateixa quantitat de lípids que de proteïnes. Aquesta família lipoproteica és molt heterogènia. Segons el mètode utilitzat, hi ha diverses classificacions i terminologies per designar les HDL.

Les partícules d'HDL es poden classificar segons la seva densitat de flotació, amb un rang definit entre 1.063 g/ml i 1.210 g/ml, concretament podem distingir dues subpoblacions majoritàries, les HDL2 (densitat entre 1,063 i 1,125 g/ mL) i les HDL3 (densitat entre 1,125 i 1,210 g/ mL).

La separació de les HDL segons la seva grandària es pot realitzar utilitzant la electroforesi en un gel no desnaturalitzant en gradient de poliacrilamida. D'aquesta manera s'obtenen poblacions que s'anomenen (de menor a major diàmetre mig) HDL3c (7,6nm), HDL3b (8,0 nm), HDL3a (8,4 nm), HDL2a (9,2nm) i HDL2b (10,6nm) [1].

Una altra classificació, basada en la mobilitat electroforètica en gels d'agarosa, engloba a les subpoblacions d'HDL segons la seva càrrega elèctrica, i per tant segons la seva mobilitat com α , β i γ [2, 3]. S'ha descrit que les dues últimes són especialment actives en els passos inicials del transport revers de colesterol (TRC) [4, 5].

En funció del contingut majoritari de apolipoproteïnes també es poden classificar les partícules d'HDL. Les apolipoproteïnes són proteïnes de composició hidrofòbica. Aquestes donen estabilitat i funcionalitat a les lipoproteïnes. L'apolipoproteïna A-I (apoA-I) és la proteïna quantitativament més abundant en HDL i l'apolipoproteïna A-II (apoA-II) és la segona apolipoproteïna més important d'HDL [6]. Segons això, les HDL també es classifiquen segons si contenen només apoA-I (LpA-I),

només apoA-II (LpA-II) o si contenen ambdues apolipoproteïnes (LpA-I /AII) [7]. Hem de tenir present, però, que aquesta classificació no té en compte el contingut de les altres apolipoproteïnes en HDL: C-I, C-II, C-II, A- IV, E, D, J. Hi ha doncs, molta heterogeneïtat apolipoproteica.

A part de les apolipoproteïnes, en el component proteic de les HDL es troben enzims que estan associats a la partícula d'HDL. Entre aquests enzims es troben els que estan associats al metabolisme de les HDL com són la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), la proteïna transferidora de èsters de colesterol (CETP) i la proteïna transferidora de fosfolípids (PLTP). A més, en aquestes partícules també es poden trobar associats altres enzims amb un paper menys clar o desconegut en les HDL com són la paraxonasa 1(PON1), paraxonasa 3 (PON3), acetilhidrolasa del factor plaquetari (PAF-AH) o la glutatió selenoperoxidasa plasmàtica (GPX3) entre d'altres [2].

2. METABOLISME I FUNCIO DE LES HDL.

2.1 BIOSÍNTESI I CATABOLISME DE LES HDL

La biosíntesi de les HDL és un procés complex on hi intervenen la síntesi i secreció del major component proteic (apoA-I i apoA-II), seguit de l'adquisició del component lipídic (fosfolípids i colesterol) i finalment la maduració de la partícula d'HDL [6].

La síntesi de les HDL es produeix a diferents nivells: hepàtic, intestinal i plasmàtic. En fetge i intestí se sintetitza apoA-I i apoA-II; l'apoA-I és secretada a la circulació com a partícula pobra en lípids (pre β -HDL) o, fins i tot, com apolipoproteïna lliure [6]. Aquestes apolipoproteïnes, gràcies al transportador ABC (*Adenosin Triphosphate Binding Cassette*) A1, capten fosfolípids i colesterol de les cèl·lules i esdevenen partícules discoïdals que evolucionaran posteriorment cap a partícules esfèriques gràcies a l'acció de la LCAT, enzim que catalitza l'esterificació plasmàtica

del colesterol, i la PTLP o PTL-2 [8, 9]. D'altra banda, també es poden sintetitzar HDL en plasma durant el catabolisme dels quilomicrons i les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), ja que el material de superfície alliberat pot formar partícules d'HDL planes (discoïdals) i partícules pre β [10]. L'actuació dels enzims i proteïnes transportadores de lípids com la CETP i la lipasa hepàtica (LH) sobre les HDL indueixen la dissociació de l'apoA-I d'aquestes lipoproteïnes [6]. L'apoA-I lliure o pobra en lípids pot formar partícules d'HDL mitjançant transport revers de colesterol o passar el filtre glomerular i ser catabolitzada a nivell tubular pel complex megalina-cubilina [11, 12]. Aquest catabolisme renal de l'apoA-I lliure explicaria el fet que el seu aclariment del plasma sigui més ràpid que el de la partícula d'HDL en conjunt.

2.2 MECANISMES DEL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL

L'HDL juga un paper molt important en l'hemostasi de colesterol: promou el flux de colesterol des de les cèl·lules dels teixits perifèrics fins a fetge, d'on és parcialment eliminat per les vies biliars, procés conegut amb el nom de transport revers de colesterol (TRC). Aquest transport revers de colesterol compren tres etapes: el flux de colesterol, l'esterificació del colesterol i la captació d'aquests èsters de colesterol per part del fetge [6].

En aquesta primera etapa, el flux de colesterol pot tenir lloc de manera inespecífica i passiva, i de manera específica i activa. En aquest últim cas, el procés és dependent del transportador ABCA1, proteïna que facilita el transport actiu de colesterol lliure i fosfolípids des de l'interior de les cèl·lules cap a les pre β -HDL [6]. Existeixen tres tipus de pre β -HDL. La prebeta1 és la partícula més petita i la que primer rep el colesterol de les cèl·lules. Després d'uns minuts, el colesterol passa a prebeta2 i prebeta3, que són partícules que van augmentant de mida [13]. El flux de colesterol també pot tenir lloc directament a partícules d'HDL madures a través del receptor

scavenger de classe B tipus-I (SR-BI) o ABC (*Adenosin Triphosphate Binding Cassette*) G1 [6].

En la segona etapa del TRC, el colesterol de les partícules d'HDL discoïdals naixents és esterificat per part de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), obtenint-se partícules d'HDL madures. Aquest procés d'esterificació és clau pel manteniment del gradient de colesterol lliure i, permet així, que l'HDL sigui acceptora de colesterol [6].

Finalment, en la tercera etapa del TRC, el colesterol esterificat de les partícules d'HDL pot : i) transferir-se selectivament a fetge, gònades i glàndules adrenals a través de SR-BI, ii) ser capturat com una partícula sencera d'HDL per part de teixits com el fetge, iii) ser transferit a partícules que contenen apoB , gràcies a la CETP, que seran posteriorment aclarides via fetge mitjançant els receptors de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDLR), de les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDLR) i de romanents (LRP) [6]. Un esquema del TRC el podem veure en la **Figura 1**.

Malgrat s'ha estudiat en detall el paper de diversos gens implicats en les diferents etapes del TRC [14], es desconeix com aquests gens regulen el flux de colesterol a través de la via sencera. S'han realitzat diferents estudis per intentar quantificar el TRC total en ratolins modificats genèticament. Una primera aproximació per quantificar el TRC total va ser mesurar la síntesi de colesterol de teixits perifèrics, que en una situació de *steady state* hauria de ser igual a la quantitat de colesterol eliminat que arriba a través de fetge. Aquest procés s'anomena flux de colesterol centrípet [15-17]. L'excreció de lípids biliars o d'esterols fecals també s'ha utilitzat per determinar la relació entre l'HDL i l'excreció d'esteroids biliars a través de fetge [18]. En un altre estudi per mesurar el TRC *in vivo*, s'ha mesurat el percentatge de la pèrdua de ³H-colesterol de múscul després de la injecció de LDL cationitzada marcada amb ³H-colesterol en múscul femoral recte [19]. El principal defecte d'aquests estudis, és que no

mesuren el TRC específic de macròfag, que és la principal cèl·lula que acumula colesterol en les lesions arterioscleròtiques [20]. A més, el mecanisme que regula el flux de colesterol des de macròfags, no té perquè ser igual que el de la resta de teixits perifèrics.

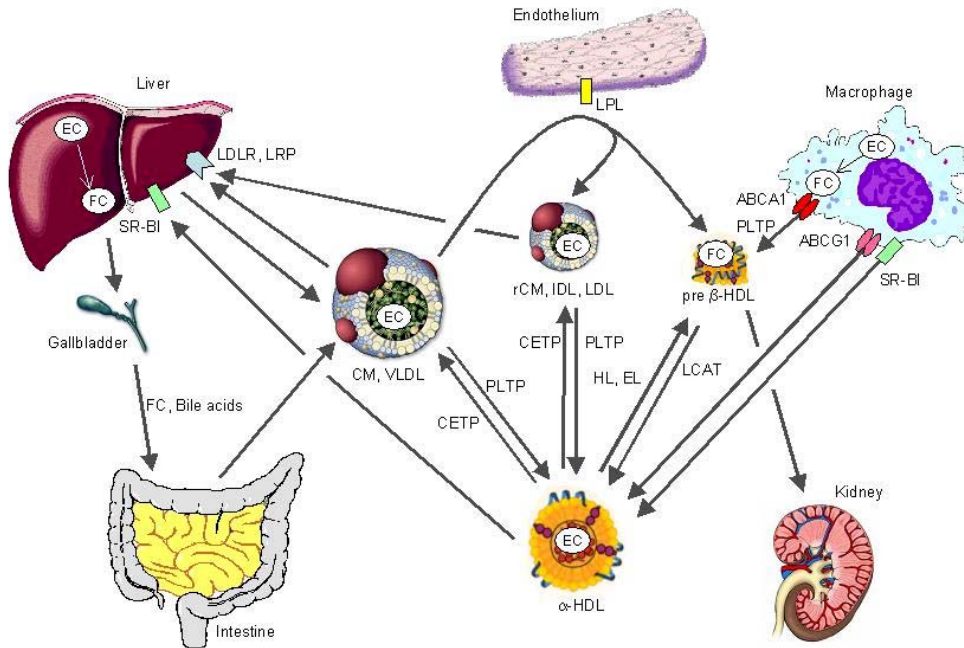


Figura 1. Esquema del TRC específic de macròfags a femtes *in vivo*. Les partícules naixents pre-β-HDL adquireixen colesterol lliure (FC) de cèl·lules perifèriques a través del transportador ABC (*Adenosin Triphosphate Binding Cassette*) A1. El colesterol lliure (FC) s'esterifica (EC) gràcies a l'enzim lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT). El receptor *scavenger* de classe B tipus-I (SR-BI) o ABC (*Adenosin Triphosphate Binding Cassette*) G1 també poden facilitar el flux de colesterol cap a partícules d'HDL madures. La lipasa hepàtica (HL) o la lipasa endotelial (EL) pot hidrolitzar els triglicèrids (TG) i fosfolípids, d'aquesta manera les partícules d'HDL grans passen a ser partícules més petites, les quals poden ser catabolitzades pel ronyó. La lipoproteïna lipasa (LPL) contribueix a la biogènesi de les HDL generant fosfolípids i apolipoproteïnes de superfície que poden ser adquirides per les HDL. El fetge pot captar selectivament EC de les partícules d'HDL a través de SR-BI i excretar-lo a bilis com a FC o àcids biliars. Els EC de les partícules d'HDL poden ser transferides a les lipoproteïnes que contenen apoB gràcies a la proteïna transferidora d'èsters de colesterol (CETP) i retornen a fetge mitjançant els receptors de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDLR), de les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDLR) i de romanents (LRP)

Una nova aproximació metodològica s'ha desenvolupat en ratolins per mesurar el TRC específic de macròfags mitjançant el seguiment de la traça de ^3H -colesterol transportat des de macròfags a femtes *in vivo* [21]. Evidentment els macròfags J744 utilitzats en aquest estudi no són equivalents a les cèl·lules escumoses de la placa arterioscleròtica. Malgrat tot, aquest mètode ha permès obtenir per primer cop una aproximació *in vivo* de l'anàlisi de l'eficiència dels diferents passos individuals que tenen lloc en aquesta via tant complexa [21-26].

Recentment, s'ha suggerit la existència d'una ruta d'excreció directa de colesterol d'origen perifèric cap a femtes a través d'intestí. S'ha demostrat que, en ratolins modificats genèticament per inactivació del gen *Mdr2 P-glycoprotein*, l'increment en l'excreció d'esterols fecals mitjançada per LXR és independent de l'excreció de colesterol biliar [27].

2.3 PROTEÏNES IMPLICADES EN EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL

2.3.1 APOA-I

L'apoA-I té un paper molt important en la regulació del metabolisme de l'HDL, tal i com es pot veure en diferents estudis amb models de ratolins modificats genèticament.

En estudis amb ratolins modificats genèticament que hiperexpressen l'apoA-I s'ha vist l'efecte ateroprotector d'aquesta proteïna [28-31], i fins i tot, s'ha observat una regressió de lesions preexistents [32]. En concordança amb aquests resultats, en ratolins que hiperexpressen l'apoA-I s'ha observat un increment del flux de colesterol cel·lular, que és el primer pas del TRC [14, 33]. Aquests resultats suggereixen que l'estimulació de la producció d'apoA-I incrementa el TRC i, per tant, que protegeix contra

l'arteriosclerosi. Malgrat això, hi ha estudis amb ratolins que hiperexpressen l'apoA-I o deficients d'apoA-I, on no s'ha detectat canvis en el flux de colesterol centrípet des de teixits perifèrics a fetge [15, 16]. Fins i tot, en un altre estudi amb ratolins que hiperexpressen l'apoA-I humana, no hi ha evidències del increment en el percentatge de la pèrdua de ^3H -colesterol de múscul [34].

Evidències directes sobre el mecanisme antiaterogènic de l'apoA-I van ser determinades gràcies a la nova aproximació metodològica per mesurar el TRC específic de macròfag. L' hiperexpressió d'apoA-I incrementava la traça de colesterol derivat de macròfags que apareixia en plasma, fetge i femtes [21]. Per tant, en ratolins modificats genèticament, no s'ha demostrat que l'apoA-I afecti al TRC total, en canvi si que és limitant en el TRC específic des de macròfags *in vivo*.

Un probable mecanisme d'acció és un augment del flux de colesterol des de macròfag a través d'ABCA1 degut a un increment d'apoA-I lliure. A més, diversos estudis amb ratolins que utilitzen pèptids recombinants amb una estructura de seqüències aminoacídiques molt semblants a l'apoA-I tenen efectes antiaterogènics [35, 36]. En un altre estudi, s'ha observat que, quan se li administra oralment un pèptid mimètic de l'apoA-I (D-4F) en ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de l'*apoE*, augmenta tant el flux de colesterol en cultius cel·lulars de macròfags, com el TRC específic de macròfags *in vivo* i redueix l'arteriosclerosi [37]. En un altre cas, s'obté un increment de la concentració de la proteïna ABCA1 en macròfags i fetge després de l'injecció d'apoA-I en ratolins [38]. En ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de l'*apoA-I* no desenvolupen més arteriosclerosi que els ratolins controls [39]; tanmateix, s'observa un increment a la susceptibilitat a l'arteriosclerosi en ratolins hipercolesterolèmics deficients de l'apoA-I, concretament en ratolins modificats

genèticament per inactivació doble dels gens de *l'apoA-I* i *LDLR* i en ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de *l'apoA-I* que hiperexpressen *l'apoB-100* humana [40, 41]. Aquestes dades concorden amb el concepte que, increments en apoA-I són ateroprotectors; d'altre banda però, la seva deficiència no té perquè provocar el desenvolupament d'arteriosclerosi sinó és que existeixen altres factors de risc [14]. Treballs amb plasma de ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de *l'apoA-I* mantenen la meitat de la capacitat del flux de colesterol. La manca de *l'apoA-I* en aquests ratolins dona lloc a un retard en la pèrdua de ^3H -colesterol emmagatzemat en el múscul femoral després de l'injecció de LDL cationitzada i marcada amb ^3H -colesterol [42]. Malgrat això, tant el flux centrípet de colesterol, com l'excreció neta d'esteroids, no presentaven canvis en ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de *l'apoA-I* [17, 43], però sí que presentaven increments en la placa ateromatosa degut suposadament al bloqueig del TRC específic de macròfags i a increments en la inflamació, encara que es mantenia la concentració de colesterol en les partícules d'HDL [22].

L'*apoA-I* Milano (*apoA-IM*) és un mutant natural d'*apoA-I* associat a concentracions baixes de colesterol d'HDL que es va identificar en un nombre d'individus del Nord d'Itàlia [44]. L'apolipoproteïna A-IM és una variant molecular de *l'apoA-I* caracteritzada per un canvi d'una arginina per una cisteïna en la posició 173 [45]. L'HDL reconstituïda (rHDL) que conté el dímer de *l'ApoA-IM* és significativament més eficient en promoure el flux de colesterol des de macròfags que la corresponent a la partícula que conté *l'apoA-I*, això corrobora el paper d'aquest dímer en el primer pas del TRC [46]. En aquest mateix sentit, s'ha demostrat que la infusió d'*ApoA-IM* en ratolins hipercolesterolèmics deficient d'*apoE*, redueix la placa de lípids

i macròfags que es troben en ateromes d'aorta [47, 48]. A més, l'ApoA-IM millora la disfunció endotelial que està associada a la mobilització del colesterol de l'aorta [49]. Recentment, en un estudi clínic pilot s'ha demostrat la regressió significativa de l'arteriosclerosi en artèries coronàries d'humans després de l'infusió d'ApoA-IM [50]. Un inconvenient important d'aquest estudi és la falta d'una comparació directe entre l'apoA-I salvatge i l'ApoA-IM.

2.3.2 APOA-II

L'apoA-II representa el 20% del contingut proteic de l'HDL. S'ha suggerit que el locus de l'apoA-II és un determinant genètic important pel que fa a la concentració de colesterol d'HDL, malgrat les diferències espècie-específic entre els efectes de l'apoA-II de ratolí i la humana. S'ha descrit que la LpA-I és més activa en el transport revers de colesterol que la LpA-I/A-II [54]. Aquest fet podria ser degut a l'habilitat de la LpA-I d'induir les dues vies a través de les quals té lloc el flux de colesterol, és a dir, la més ràpida i específica, i la més lenta i inespecífica, mentre que la LpA-I/A-II indueix principalment l'última [54].

La hiperexpressió de l'apoA-II en ratolins transgènics s'ha realitzat utilitzant tan el gen humà com el gen de ratolí. El desenvolupament d'aquests ratolins ens ha permès comprendre millor el paper de l'apoA-II en la susceptibilitat a l'arteriosclerosi.

La hiperexpressió d'apoA-II murídica s'ha demostrat que és proaterogènica [55]. Igualment en ratolins que hiperexpressen l'apoA-II humana, però en aquest cas, només quan són alimentats amb una dieta aterogènica [56], o quan s'encreuen amb ratolins deficient d'apoE i són alimentats amb una dieta de manteniment [57], o en els dobles transgènics d'apoA-II/CETP [58].

La majoria dels estudis han avaluat la funció de l'apoA-II en els passos individuals del TCR, però no en la via completa. El plasma de ratolins transgènics de apoA-II humana estimula el flux de colesterol en macròfags J744 que expressen ABCA1 [59], mentre que el flux es troba disminuït des de cèl·lules hepàtiques Fu5AH que expressen el receptor *scavenger* SR-BI [59-61].

L'apoA-II exerceix un efecte negatiu en la unió específica a SR-BI [62, 63], i en la transferència del colesterol esterificat mitjançada pel receptor SR-BI en alguns estudis [62, 64], però no en tots [63]. A més, la concentració d'apoA-II murídica en HDL de ratolins transgènics i ratolins deficients de l'apoA-II, esta inversament correlacionada amb la unió i captació específica d'èsters de colesterol per part d'ambdós receptors scavenger, SR-BI i CD36 .

2.3.3 CETP

L'acció de la proteïna transferidora d'èsters de colesterol (CETP) té com a resultat la transferència neta d'èsters de colesterol a les partícules riques en triglicèrids i de triglicèrids cap a les LDL i HDL [66]. Els ratolins no tenen aquesta proteïna en plasma. La hiperexpressió de CETP humana o de macaco (*Cynomolgus monkey*) en ratolins transgènics redueix el colesterol d'HDL [67-69] i incrementa l'HDL-pre β [70]. S'ha trobat també que una reducció en l'expressió de LDLR en ratolins transgènics de CETP és indicatiu d'un increment del TRC a fetge [71]. Malgrat tot, la magnitud del flux de colesterol centrípet des de la perifèria a fetge no es troba alterada en ratolins transgènics de CETP de macaco o humana [15, 16]. A més, concentracions elevades de CETP en aquests ratolins, no augmenten la renovació de colesterol des de múscul [72].

Des de que va ser descrita aquesta proteïna, la seva relació en humans amb l'arteriosclerosi ha estat discutida [73]. Els ratolins transgènics de CETP humana o de primat, presenten un increment en la mida de la lesió arterioscleròtica en resposta a una

dieta aterogènica [74, 75]. De la mateixa manera, en ratolins transgènics de CETP humana encreuats amb ratolins modificats genèticament per inactivació del gen del receptor de *LDL* o d' *apoE*, es va observar un increment en l'àrea de la lesió arterioscleròtica [76]. Contràriament, en altres estudis, l'expressió de CETP en ratolins hipertriglicèridèmics transgènics d'*apoCIII*, en transgènics de *LCAT*, en ratolins *db/db* i en ratolins deficients d'*SR-BI*, es redueix l'àrea de la lesió arterioscleròtica [75, 77-79].

Actualment, es desconeix si aquestes diferències poden ser explicades per diferents efectes sobre el TRC específic de macròfags o degut a altres mecanismes antiaterogènics de l'HDL. Tampoc està clar, si deficiències genètiques de CETP en humans protegeixen o no de patir malalties cardiovasculars aterotrombòtiques [80, 81].

Malgrat tot, moltes estratègies han estat desenvolupades per tal d'inhibir la CETP i incrementar el colesterol d'HDL [80, 82]. El torcetrapib, un inhibidor de CETP, ha estat provat en humans i es va observar un increment de un 50-100% de colesterol d'HDL [83]. Malauradament, en un estudi recent (ILLUMINATE) amb pacients tractats amb torcetrapib i atorvastatina, va haver de ser suspès inesperadament degut a un increment en la tasa de mortalitat i en el nombre d'esdeveniments cardiovasculars [84, 85]. En qualsevol cas, en estudis posteriors en individus tractats amb torcetrapib, no han revelat canvis en la progressió de la lesió arterioscleròtica a nivell coronari [86]. No hi ha una resposta clara si el problema és la molècula en si mateixa o el mecanisme. D'altra banda, el JTT-705, un altre inhibidor de CETP, també s'ha vist que incrementa el colesterol d'HDL en humans i conills, i en aquest últim cas es redueix l'arteriosclerosi [87, 88].

2.3.4 LCAT

S'ha hipotetitzat sobre el paper de l'LCAT com a potencial diana terapèutica en incrementar el colesterol d'HDL i modular el TRC [82, 89, 90]. En hàsters l'expressió de LCAT a través d'adenovirus, indueix un increment en l'excreció de colesterol biliar [91]. Tanmateix, la hiperexpressió de LCAT en ratolins no estimula el flux de colesterol centrípet des de teixits extrahepàtics i no s'incrementa l'excreció de colesterol biliar ni la d'àcids biliars totals [16, 91].

Pel que fa a la susceptibilitat a l'arteriosclerosi, la hiperexpressió de LCAT en ratolins transgènics no ha permès obtenir resultats consistents [92-94], segurament degut a que l'efecte antiaterogènic de l'LCAT necessita de l'activitat de la CETP [77]. Tant l'augment com la reducció de la susceptibilitat a l'arteriosclerosi també ha estat observada en ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de la *LCAT*, malgrat la deficiència de colesterol d'HDL [95-97].

2.3.5 SR-BI

El receptor SR-BI té com a funció la unió selectiva i el flux bidireccional de colesterol i altres lípids entre l'HDL i les cèl·lules [98-101], particularment en hepatòcits i cèl·lules esteroideogèniques [102, 103]. El receptor SR-BI també s'expressa en macròfags i cèl·lules espumoses carregades de lípids de les plaques ateromatoses, cèl·lules endotelials, cèl·lules de Kupffer de fetge i varis tipus cel·lulars [100, 101, 104].

La importància del receptor SR-BI en el metabolisme de l'HDL es va poder establir manipulant el gen *SR-BI* en ratolins [100, 105, 106]. Els ratolins modificats genèticament per inactivació del gen del receptor *SR-BI* presenten increments de colesterol d'HDL, una reducció del aclariment selectiu del colesterol d'HDL [107, 108], una disminució en la concentració de colesterol biliar i la secreció de colesterol biliar

bloquejada [109-111]. La hiperexpressió hepàtica de SR-BI utilitzant la transfecció del gen amb adenovirus recombinants o utilitzant ratolins transgènics, s'associava a una disminució en la concentració en plasma del colesterol d'HDL [112, 113], increments en l'aclariment dels èsters de colesterol d'HDL [112, 114, 115] i increments de colesterol biliar [113, 115, 116]. Aquest resultat suggereixen la importància de l'expressió hepàtica del receptor SR-BI en el TRC, controlant la utilització del colesterol d'HDL en la secreció biliar. D'altra banda, el receptor SR-BI facilita el TRC incrementant l'aclariment de les lipoproteïnes que contenen apoB [112, 114, 117, 118].

Malgrat tot, la hiperexpressió de SR-BI no afecta el flux de colesterol centrípet des de teixits extrahepàtics a fetge [16]. A més s'ha demostrat que, el *pool* i la composició d'àcids biliars, l'excreció fecal d'àcids biliars i la síntesi d'esterols en fetge, no estava afectada en ratolins deficientes del receptor SR-BI [111]. No està clar, però, si aquesta falta d'efecte sobre el flux de colesterol centrípet i sobre la síntesi d'esterols en fetge és el resultat de l'existència de vies compensatòries per mantenir la concentració de colesterol hepàtic i extrahepàtic [16, 111].

La relació entre l'expressió hepàtica de SR-BI i l'arteriosclerosi és oposada. La hiperexpressió hepàtica de SR-BI en ratolins redueix dramàticament la concentració del colesterol d'HDL [112, 113], però també redueix l'arteriosclerosi [119-121]. En canvi, la deleció o l'atenuament de SR-BI en ratolins dóna lloc a increments en la concentració de colesterol d'HDL [107, 108], però un increment considerable en l'arteriosclerosi [109, 122, 123]. En aquest sentit, en un altre estudi es va demostrar que la hiperexpressió hepàtica de SR-BI, malgrat tenir efectes inversos sobre l'estat estacionari en plasma de la concentració de colesterol, era un important regulador positiu del TRC en macròfags [23]. La pèrdua d'expressió de SR-BI en ratolins deficientes d'apoE, permet l'aparició de disfuncions cardiovasculars prematures [109, 122].

Tal i com s'ha dit anteriorment, l'expressió de SR-BI en cèl·lules escumoses de la paret arterial promou el primer pas en el TRC específic de macròfag [124]. En aquest mateix sentit, l'eliminació selectiva de l'expressió de SR-BI en cèl·lules derivades del moll de l'ós en ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de *LDLR*, s'observa un increment de l'arteriosclerosi induïda per la dieta [123]. En canvi, en un estudi recent, s'ha descrit que la injecció en ratolins controls de macròfags primaris deficients de SR-BI respecte de la injecció de macròfags controls no va alterar el TRC específic de macròfags *in vivo* [125]. El receptor SR-BI també està implicat en l'alliberament d'antioxidants, en la relaxació arterial òxid nítric dependent i en l'eliminació de cèl·lules apoptòtiques, característiques que podrien contribuir en el paper antiaterogènic d'aquest [126, 127].

Un altre fet que cal destacar, és que el receptor SR-BI pot canviar el seu paper funcional quan el sèrum amiloide A (SAA) està present. S'ha demostrat en un estudi amb ratolins que hiperexpressen SAA mitjançant la transfecció del gen per adenovirus, que l'HDL aïllada, que conté SAA, pràcticament no té cap efecte en la unió a SR-BI, però sí que disminueix la captura selectiva d'èsters de colesterol [128].

2.3.6 ABC

La superfamília dels transportadors actius ABC (*Adenosin Triphosphate-Binding Cassette*), és bàsic pel transport, a través de la membrana cel·lular, d'una ampla gamma de substrats que inclouen lípids, aminoàcids, lipopolisacàrids, proteïnes, pèptids, sucres, metalls, ions inorgànics i medicaments [129]. Utilitzen la energia derivada de la hidròlisi d'ATP per transportar el substrat contra gradient. Aquest transportadors estan catalogats en set subfamílies de proteïnes: de l'ABCA a l'ABCG [130].

El receptor de fetge X (LXR) α és un receptor nuclear activat per oxisterols [131]. Actua hiperexpressant un cert nombre de gens diana relacionats amb el TRC, com els transportadors ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 i el CYP7A1 (*murine cytochrome P450 family 7 subfamily A polypeptide 1*) [132-136]. Lligands sintètics de LXR, estimulen el flux de colesterol en cultius cel·lulars de macròfags [136, 137], bloquegen la progressió de l'arteriosclerosi i inclús promou la regressió d'aquesta en ratolins [138-140]. Aquest efecte s'ha comprovat que depèn de la presència de LXR en macròfags [140]. D'altra banda, el GW3965, agonista sintètic del LXR, promou el TRC específic des de macròfag a femtes *in vivo* [26].

A continuació, es descriuen els transportadors més rellevants per aquest estudi.

2.3.6.1 ABCA1

El transportador ABCA1 transporta colesterol i fosfolípids del interior de la cèl·lula fins a les apolipoproteïnes unides a la superfície cel·lular (apoA-I), essent aquest el primer pas clau i limitant de la síntesi d'HDL. Mutacions en el gen *ABCA1* en humans causen la malaltia de Tangier, caracteritzada per una acumulació de colesterol en el sistema reticuloendotelial i una reducció de la concentració de colesterol d'HDL [141-143]. Molts estudis han determinat que el fetge i l'intestí juguen un paper determinant en el manteniment de la concentració d'HDL i en la biogènesi de les partícules d'HDL naixents, que són les principals acceptores de colesterol via ABCA1 provinent del flux des de teixits perifèrics [144-148].

La hiperexpressió d'ABCA1 en ratolins transgènics, incrementa la concentració d'HDL i redueix l'arteriosclerosi [144, 149]. Aquest ratolins transgènics presenten un augment significatiu en l'alliberament exogen hepàtic d'èsters de colesterol d'HDL marcats radioactivament, i també, un increment en l'excreció de colesterol biliar, indicant que una activació del transportador ABCA1 facilitaria el TRC [144]. Malgrat

tot, no hi ha efectes obvis en el TRC total en ratolins modificats genèticament per inactivació del gen *ABCA1*, malgrat la absència esperada d'HDL. El transport hepatobiliar de colesterol no està bloquejat en ratolins modificats genèticament per inactivació del gen *ABCA1*[150]. S'ha determinat també, que l'increment en l'excreció de colesterol hepatobiliar i fecal induïda per LXR és independent d'ABCA1 [151]. Amb tot, experiments recents han demostrat que en soques de ratolins hiperlipidèmics, la inactivació selectiva de l'ABCA1 en macròfags, incrementa l'arteriosclerosi en absència de canvis en la concentració d'HDL en plasma [152]. Una possible explicació d'aquest fet, seria que, el flux de colesterol des de macròfags en aquests ratolins no compensa l'acumulació de colesterol dels macròfags deficients d'ABCA1 que es troben en la paret arterial. Aquests estudis també indiquen que l'acumulació de colesterol de macròfags, malgrat ser important en el desenvolupament de l'arteriosclerosi, no afecta a les concentracions de colesterol d'HDL [152]. En aquest sentit, ratolins modificats genèticament per inactivació específica del gen *ABCA1* de fetge presentaven una disminució de la concentració de colesterol d'HDL [153].

2.3.6.2 ABCG1

La proteïna transportadora ABCG1 s'expressa tant en macròfags com en cèl·lules endotelials. Està hiperexpressat quan el macròfag està carregat de colesterol [154-156]. També s'ha descrit que l'ABCG1 promou el flux de colesterol des de cèl·lules vasculars a HDL [157, 158]. Els ratolins deficients d'ABCG1 presenten una gran acumulació de lípids neutres i fosfolípids en els hepatòcits i en macròfags de diferents teixits després d'una dieta rica en greixos i colesterol, sense canvis en l'HDL de plasma [158]. Contràriament, els ratolins transgènics ABCG1 estan protegits

d'aquesta acumulació. En ratolins que hiperexpressen ABCG1 en fetge (utilitzant vectors ABCG1 recombinants) presenten una disminució d'HDL en plasma i un increment de l'excreció de colesterol biliar [159]. Tots aquest estudis, suggereixen el paper determinant del ABCG1 com a mitjancer del flux de colesterol des de macròfag a les HDL madures en alguns teixits i en el TRC . En un estudi recent el TRC específic de macròfags estava disminuït en ratolins als quals se'ls va injectar macròfags que tenien una deleció del gen *ABCG1* [125].

2.3.6.3 ABCG5 I ABCG8

Els transportadors ABCG5 i ABCG8 actuen com a heterodímers formant un complex funcional (ABCG5/G8). La seva funció és la de secretar esterols vegetals i colesterol a la bilis, en el cas dels transportadors situats a nivell hepàtic, i al lumen intestinal, en aquells transportadors situats a l'intestí [160, 161]. Deficiències genètiques d'aquest transportador provoquen sitoesterolemia en humans [162, 163]. Aquesta malaltia es caracteritza per l'acumulació d'esterols vegetals, i en menor grau de colesterol, en plasma i teixits [164].

En els ratolins transgènics que hiperexpressen ABCG5/G8 i els ratolins que són tractats amb activadors del receptor de fetge X (LXR), s'observa increments en l'excreció hepatobiliar de colesterol i l'excreció fecal d'esterols neutres [165-169], essent aquest fet dependent de ABCG5/G8 [166]. En ratolins modificats genèticament per inactivació d'ambdós gens, s'observa l'efecte contrari en l'excreció hepatobiliar d'esterols [170]. Cal destacar que, la hiperexpressió d'ABCG5/G8 humana en ratolins transgènics, també redueix l'absorció intestinal de colesterol [165], encara que l'efecte contrari no s'observa en ratolins deficientes d'*ABCG5/G8* [166, 170, 171]. Els resultats que s'han obtingut, tenint en compte que el transportador ABCG5/G8 no s'expressa en

macròfags, donen suport al fet que l'activació per LXR modula la via del TRC específic de macròfag incrementant l'excreció biliar de colesterol mitjançant una hiperexpressió del RNAm d'ABCG5 i ABCG8 [166]. Malgrat tot, el paper del heterodímer ABCG5/G8 en el TRC específic des de macròfag a femtes *in vivo* encara s'ha de determinar directament [172, 173].

2.4 PROPIETATS ANTIOXIDANTS I ANTIINFLAMATÒRIES DE LES HDL.

2.4.1 MECANISMES

Un altre mecanisme que explicaria l'efecte ateroprotector de les HDL, seria el d'inhibir la modificació oxidativa de les LDL. L'LDL oxidada juga un paper determinant en l'aparició inicial i progressió de la lesió arterioscleròtica. L'LDL atrapada en l'espai subendotelial de la paret arterial és susceptible a patir modificacions oxidatives a través dels productes de la via de les lipooxigenases i mieloperoxidases [174], o probablement, per molècules prooxidants derivades del metabolisme cel·lular. Concretament, l'oxidació del àcid araquidònic dels fosfolípids de les LDL, donen lloc a productes proinflamatoris, que provoquen una resposta immunitària en la paret arterial, incloent la inducció de molècules d'adhesió i de factors quimiotàctics de monòcits que faciliten la formació de cèl·lules escumoses [174].

El paper *in vivo* de la via de les lipooxigenases es va determinar gràcies a la generació de ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de la *lipooxigenasa 12/15*. En aquest ratolins deficients de la lipooxigenasa 12/15 i deficients també d'apoE o de LDLR, es va demostrar una menor peroxidació de lípids i una disminució significativa de la lesió arterioscleròtica [175-177]. D'altre banda, en ratolins deficients del receptor LDL i que hiperexpressen la lipooxigenasa 15 en

l'endoteli vascular, s'ha observat una acceleració en l'aparició de la lesió arterioscleròtica [178].

S'ha demostrat que l'HDL protegeix tant a les LDL d'oxidar-se, com també, atenua l'activitat biològica de les LDL ja oxidades. Aquestes propietats antioxidant i antiinflamatòria de l'HDL s'atribueixen a diverses proteïnes associades a ella. Malgrat que, les propietats antioxidants s'han atribuït a l'apoA-I i l'apoA-II [179], també es creu que una part d'aquestes propietats antioxidants està relacionada amb enzims com: la paraxonasa 1 (PON1) [180-182], la paraxonasa 3 (PON3) [183, 184], l'acetil hidrolasa del factor plaquetari (PAF-AH) [185] i la LCAT [186]. Aquests enzims són capaços de convertir els àcids grassos oxidats amb propietats inflamatòries amb d'altres que no tenen activitat biològica. (veure **Figura 2**).

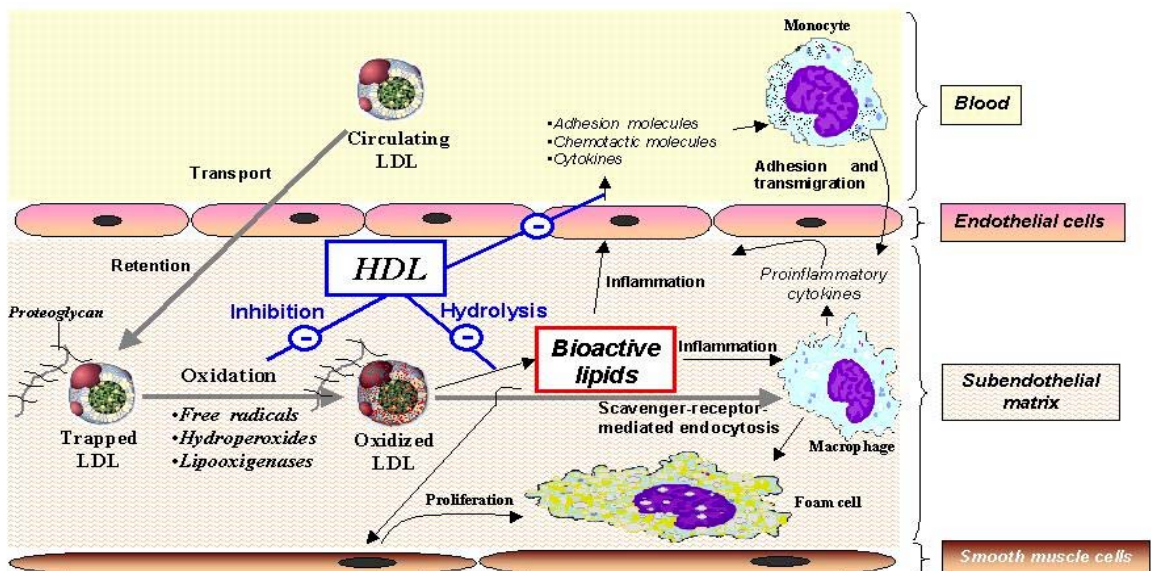


Figura 2. Esquema de les propietats antioxidants/antiinflamatòries de les HDL en la progressió de la lesió arterioscleròtica. L'LDL circulant es transportada a través del endoteli i pot ser retinguda per proteoglicans en la matriu subendotelial. Aquesta LDL és susceptible a patir modificacions oxidatives degudes a hidroperòxids o radicals lliures que provenen del metabolisme cel·lular i a enzims com les lipooxigenases o mieloperoxidases. L'LDL oxidada conté lípids oxidats, especialment fosfolípids, que tenen efectes proinflamatoris que provoquen alhora una sèrie de respostes inflamatòries en macròfags i cèl·lules endotelials. Aquests macròfags capturen aquestes LDL oxidades i es transformen en cèl·lules escumoses, que és la principal cèl·lula que acumula colesterol en les lesions arterioscleròtiques. L'HDL té propietats antioxidants i antiinflamatòries que poden actuar en diferents punts i limitar aquest procés. L'HDL inhibeix la modificació oxidativa de l'LDL i es capaç d'inactivar lípids proinflamatoris oxidats a través d'enzims associats. També inhibeix l'expressió de molècules d'adhesió i de factors quimiotàctics de monòcits, reduint així l'entrada de monòcits a la paret arterial.

2.4.2 APOA-I

A part del paper de l'apoA-I en el TRC discutit anteriorment, diversos estudis indiquen que l'apoA-I pot inhibir diferents etapes del procés d'acumulació de lípids oxidats, que donarien lloc a l'inflamació i a l'aparició de lesions arterioscleròtiques. En un estudi *in vitro* i un altre *in vivo* amb infusions d'apoA-I en ratolins o humans, es va descriure la capacitat de l'apoA-I d'eliminar els hidroperòxids de les LDL, protegint d'aquesta manera a la LDL de les modificacions oxidatives [187]. La partícula d'HDL acumula més lípids amb hidroperòxids, tant en ratolins com en humans [188]. En cultius de cèl·lules hepàtiques, aquests lípids són aclarits més ràpidament que els que no estan modificats [189, 190], suggerint-se un paper important de l'HDL en l'eliminació de molècules oxidades.

L'HDL aïllada de ratolins transgènics d'apoA-I humana atenuen la modificació oxidativa de les LDL [191]. Aquest fet podria ser un indicador del paper de l'apoA-I en la immunitat, ja que l'HDL és un dels components majoritaris de la sang que s'uneix al

lipopolisacàrid bacterial (LPS) [192], i se sap que elevades concentracions d'HDL protegeixen els animals del xoc sèptic induït per LPS [193].

L'administració de pèptids mimètics d'apoA-I en ratolins deficient d'apoE, redueix l'arteriosclerosi i aquest efecte és degut tant a l'augment del TRC com a la disminució dels processos oxidatius dels lípids d'LDL [35, 194]. Aquests estudis suggereixen que els pèptids sintètics, com l'apoA-I nativa, podrien actuar en l'HDL com agents antioxidants i antiinflamatoris [195].

A part de la capacitat de retirar les molècules oxidants de les LDL i de disminuir l'activitat dels hidroperòxids, es creu que la principal funció antiinflamatòria i antioxidant de l'apoA-I és la de transportar i estabilitzar els enzims antioxidants de l'HDL [179]. D'entre aquest enzims tenim la PON i la PAF-AH. La variabilitat en l'activitat PON correlaciona amb el colesterol d'HDL i l'apoA-I, i això pot reflectir la estabilització de la PON1 per part de l'apoA-I en la partícula d'HDL. En ratolins deficientes d'apoA-I, es va observar una reducció de l'activitat PON de més del 60% i del potencial antiinflamatori de les seves HDL [22]; les concentracions de PON es van restablir, quan en aquest ratolins se'ls va injectar adenovirus que codificaven per l'apoA-I humana [196]. En ratolins transgènics d'apoA-I humana es va observar increments en l'activitat PON1 i PAF-AH [197]. Aquest fet, dona suport a altres estudis on es suggeria que l'activitat de la PON s'estabilitza en presència de la apolipoproteïna, malgrat la presència de l'apoA-I no és necessària per la associació de la PON a l'HDL [198].

En un altre estudi amb ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de l'*apoA-I* encreuats amb ratolins modificats genèticament per inactivació doble del gen del receptor *LDLR/apobec* susceptibles a l'arteriosclerosi, s'observa que l'apoA-I és necessària perquè l'HDL retengui les seves propietats antiinflamatòries [22]. A més, en

absència d'apoA-I, tant la LDL com la HDL esdevenen més inflamatòries, i com a conseqüència, s'incrementa la concentració de MCP-1 provocant la migració de monòcits i el desenvolupament de la placa ateromatosa [22].

Cal destacar també, que increments d'apoA-I i de colesterol d'HDL, inhibeixen la formació de cèl·lules escumoses en ratolins transgènics d'apoA-I i deficients d'apoE en diferents etapes del procés inflamatori sense incrementar l'associació d'HDL-PON [199]. En concordança amb aquest estudi, s'ha demostrat un increment de la expressió de phospho-Akt, phospho-ERK1/2, i TGF-beta2 en aortes de ratolins transgènics d'apoA-I en comparació als ratolins deficients d'apoA-I [200]. De la mateixa manera l'expressió de phospho-Smad2/3, que és un factor de transcripció activat per TGF-beta, també està incrementat en els ratolins transgènics [200]. Els resultats d'aquest estudi presenten doncs, una nova diana que explicaria els efectes antiaterogènics de l'HDL.

2.4.3 APOA-II

L'HDL aïllada de ratolins transgènics d'apoA-II murídica és incapaç de protegir a LDL de l'oxidació per cèl·lules vasculares [201], i aquesta pèrdua de la capacitat protectora és atribuïda a una menor activitat de la PON en les partícules d'HDL d'aquests ratolins. Resultats molt semblants es van obtenir en un altre soca de ratolins que hiperexpressaven apoA-II humana, on la capacitat de l'HDL de protegir de les modificacions oxidatives de les lipoproteïnes que contenen apoB estava bloquejada [202]. En aquest mateixos ratolins, també hi ha una disminució en la concentració d'apoA-I i de la activitat PON i PAF-AH que està relacionada amb aquest bloqueig. Aquest fet, segurament, està relacionat amb la major susceptibilitat a les lesions arterioscleròtiques d'aquest ratolins[202]. El desplaçament en l'HDL de l'apoA-I i de la PON per part de l'apoA-II podria explicar, en part, la disminució de la concentració

d'aquestes proteïnes en aquest model animal [202] i també per què la PON es troba més freqüentment en partícules d'HDL amb apoA-I però sense apoA-II [203, 204].

En un altre estudi, es va veure que substituint el domini central de l'apoA-I per un segment de l'apoA-II humana en ratolins deficients de l'apoE s'incrementava l'estrès oxidatiu i es bloquejava la capacitat protectora de l'HDL en front la modificació oxidativa de les LDL, sense que s'alterés la capacitat del plasma d'induir el flux de colesterol [205]. Tots aquests estudis suggereixen que l'apoA-II exerceix la seva funció proaterogènica contrarestant les propietats antioxidants de l'HDL [201, 202]. No obstant, en un altre soca de ratolins transgènics d'apoA-II humana generats independentment, s'ha descrit que l'HDL mostra un increment relatiu en la protecció a la modificació oxidativa de les VLDL, malgrat la disminució en la concentració del colesterol d'HDL, PON i PAF-AH [206]. Les raons d'aquestes discrepàncies no estan molt clares. Hi ha dos fets que s'han de tenir en compte: en primer lloc, en aquest últim estudi, els ratolins transgènics d'apoA-II humana van alimentar-se amb una dieta de manteniment, situació en la qual no desenvolupen increments en l'arteriosclerosi; I en segon lloc, la concentració en plasma de l'apoA-II humana en aquests ratolins era més baixa que en ratolins transgènics alimentats amb una dieta aterogènica (rica en greixos i colesterol) [202, 206]. Se sap que llargs períodes d'alimentació amb una dieta aterogènica provoquen una disminució en l'activitat PON1 [207], i elevades concentracions en plasma d'apoA-II humana poden alterar notablement la resta del sistema antioxidant de l'HDL format per l'apoA-I, PAF-AH i LCAT.

2.4.4 PON1

La PON1 és un enzim calci-dependent, que pertany al grup de les esterases[208]. És capaç de catalitzar la hidròlisi de compostos organofosforats i fosfolípids oxidats [180, 209]. També té activitat peroxidasa, lactonasa i arilesterasa.

L'activitat PON1 ha atret l'atenció per la seva capacitat de hidrolitzar lípids oxidats de la LDL i per tant mostra la seva possible participació en el desenvolupament de l'arteriosclerosi [210, 211].

S'ha demostrat que la PON1 protegeix a l'LDL de l'oxidació, reverteix els efectes de l'LDL oxidada i preserva la funció de la l'HDL inhibint la seva oxidació [212]. Evidències directes entre la activitat PON1 i el desenvolupament de plaques arterioscleròtiques van ser confirmades *in vivo* en ratolins deficients de PON1 [213]. Concretament, en ratolins modificats genèticament per inactivació del gen de la *PON1* es va observar que l'HDL d'aquest ratolins no era capaç de protegir a l'LDL de l'oxidació en cultius cel·lulars de paret arterial [213]. A més, els ratolins deficients de PON1 alimentats amb una dieta aterogènica o creuats amb ratolins deficients d'apoE, mostraven un increment en la lesió arterioscleròtica [214]. L'LDL d'aquest ratolins, presentava concentracions més elevades de fosfolípids biològicament actius i l'HDL no era capaç de protegir a la LDL de l'oxidació [214]. En un altre estudi amb macròfags aïllats de ratolins deficients de PON1, s'observava un increment en el contingut de lípids peroxidats i un increment del estrès oxidatiu [215].

D'altre banda, en ratolins que hiperexpressen la PON1, presentaven activitats més elevades de PON1 en les partícules d'HDL, sense que aquestes canviessin de composició o mida, i les HDL aïllades d'aquests ratolins eren més resistents a la peroxidació de lípids que les HDL dels ratolins controls [216]. L'HDL aïllada de ratolins que hiperexpressen la PON1 humana presentaven un augment en l'habilitat de protegir l'LDL en front l'oxidació [216]. En aquest mateix sentit, els ratolins C57BL6

que hiperexpressen la PON1 humana encreuats amb ratolins deficients d'apoE, desenvolupaven lesions arterioscleròtiques significativament més petites [217]. En un altre estudi on la PON humana era expressada en macròfags, es va observar una reducció en l'estrès oxidatiu de macròfags [218]. També es van obtenir les aortes d'aquests ratolins i es va observar una disminució en la concentració dels lípids peroxidats, una disminució en la capacitat d'oxidar la LDL i increments de la concentració de la glutatió (GSH) [218]. Tots aquests estudis, corroboren la hipòtesi que la PON1 protegeix contra la arteriosclerosi i contribueix a la capacitat antioxidant de l'HDL.

2.4.5 PAF-AH

És una fosfolipasa de tipus VIIA associada a HDL en ratolins que hidrolitza l'enllaç èster sn-2 del factor activador plaquetari, alliberant acetat i lisofosfatidilcolina [219]. També, hidrolitza els àcids grassos oxidats dels fosfolípids de les LDL mínimament oxidades i això evita que les cèl·lules endotelials segreguin factors inflamatoris que promouen la unió de monòcits.

Actualment, no s'ha desenvolupat cap ratolí transgènic o *knockout* que hiperexpressi la PAF-AH, encara que sí que hi ha estudis que han utilitzat la transferència de gens somàtics. En la transferència d'adenovirus de PAF-AH humana en ratolins deficients d'apoE, es va observar que disminuïa la capacitat dels macròfags de dirigir-se al endoteli degut a una reducció del estrès oxidatiu [220]. En aquest mateix sentit, en un altre estudi amb ratolins deficients d'apoE que se'ls administrava intravenosament un adenovirus de PAF-AH humana específic de fetge, s'observava una disminució de lipoproteïnes oxidades i una inhibició de la formació de dany de la neoíntima i de la arteriosclerosi espontània. La PAF-AH humana s'uneix a totes les lipoproteïnes de ratolí i les protegeix de l'oxidació, disminuint l'oxidació de lípids i

preservant les funcions de l'HDL [221]. La transferència del gen de la *PAF-AH* en múscul esquelètic de ratolins deficients d'apoE també està associat amb una reducció de la lesió arterioscleròtica [222]. En ratolins deficients d'apoE, s'observaven concentracions més baixes de PAF-AH, i això era concomitant amb increments de les concentracions circulants de fosfolípids oxidats [223].

Aparentment, sembla que la PAF-AH podria actuar amb cooperació amb la PON en la protecció de la modificació oxidativa de la LDL. Aquesta hipòtesi està basada en el fet que el ratolí deficient de PON1 presenta bloquejada la protecció de l'HDL davant l'oxidació de LDL, malgrat tenir una activitat PAF-AH normal [213].

D'altra banda, en un nombre creixent d'estudis epidemiològics en humans s'ha suggerit que increments de PAF-AH és un predictor independent d'episodis cardiovasculars [224, 225]. Aquest fet podria estar relacionat amb una associació més estreta de la PAF-AH amb les partícules de LDL aterogèniques més denses [226, 227]. El fet que la PAF-AH en humans actuï com a mitjancera en la formació de mediadors lipídics bioactius nocius, podria explicar el seu potencial paper proinflamatori [225]. Per això, l'avaluació funcional de la PAF-AH en ratolins es veu dificultada pel fet que la PAF-AH es troba associada normalment a l'HDL, protegint a la LDL de la modificació oxidativa i del desenvolupament de la arteriosclerosi.

2.4.6 CETP

Les propietats antioxidants de l'HDL han estat estudiades indirectament determinant les activitats enzimàtiques antioxidants en individus amb mutacions funcionals de CETP o després de la inhibició farmacològica de l'activitat CETP. Els resultats d'aquests estudis són escassos i ambigus. L'activitat PON1 no es troba consistentment incrementada en individus homozigots deficient de CETP [228].

Tanmateix, la inhibició de l'activitat de CETP, per part del fàrmac JTT-705, en pacients amb hipoalfalipoproteïna familiar, va incrementar la activitat PON1 i va disminuir els autoanticossos contra l'oxidació de LDL [229]. Més recentment, Zhang et al. van demostrar que les activitats PON1 i PAF-AH estaven incrementades en ratolins tractats amb JTT-705 [230], però aquest fet no es va reproduir en un estudi previ [231].

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi i objectius

Estudis clínics i epidemiològics han demostrat l'existència d'una relació inversa entre la concentració en plasma de colesterol HDL i el risc de patir malalties cardiovasculars aterotrombòtiques. Els efectes cardioprotectors s'han atribuït al paper de l'HDL en el transport revers de colesterol (TRC), i més concretament, el transport revers de colesterol específic de macròfags, i a les propietats antioxidants de l'HDL. L'expressió i/o inactivació selectiva de gens en ratolins ha permès obtenir una valuosa informació sobre el paper fisiològic de diverses proteïnes en el metabolisme de les HDL. L'expressió d'apoA-II i CETP en ratolins transgènics redueix el colesterol d'HDL i augmenta la susceptibilitat a l'arteriosclerosi. D'altra banda, el tractament amb agonistes de l'LXR i l'expressió dels gens ABCA-1 i ABCG5/G8, dianes moleculars dels activadors de LXR, redueix l'arteriosclerosi. Així, l'expressió d'apoA-II i CETP i la inactivació d'ABCA-1 i ABCG5/G8 pot reduir el TRC específic de macròfags i augmentar l'arteriosclerosi. A més, l'hiperexpressió de CETP pot afectar a les propietats antioxidants de l'HDL. Existeix doncs, la possibilitat d'intentar correlacionar la susceptibilitat a l'arteriosclerosi i les funcions antiaterogèniques de l'HDL. Per això, els objectius d'aquesta tesi van ser:

1. Avaluar l'efecte de l'expressió de la apoA-II humana en ratolins transgènics sobre el TRC des de macròfags a femtes *in vivo*.
2. Determinar l'efecte de la inactivació d'ABCA1 en ratolins modificats genèticament sobre el TRC des de macròfags a femtes *in vivo*.
3. Avaluar l'efecte de la variació de l'activitat CETP en ratolins transgènics sobre les dues principals propietats antiaterogèniques de les HDL: el TRC específic de macròfags a femtes *in vivo* i les propietats antioxidants de l'HDL.

4. Analitzar l'efecte de la deficiència del transportador ABCG5 i ABCG8 en ratolins *knockout* sobre el TRC des de macròfags a femtes *in vivo*, així com, el TRC específic de macròfags induïts pels agonistes d'LXR.

Hipòtesi i objectius

P. PUBLICACIONES

**P.1 OVEREXPRESSION OF HUMAN APOLIPOPROTEIN
A-II IN TRANSGENIC MICE DOES NOT IMPAIR
MACROPHAGE-SPECIFIC REVERSE CHOLESTEROL
TRANSPORT IN VIVO**

Noemí Rotllan, Vicent Ribas, Laura Calpe-Berdiel, Jesús M.Martín Campos, Francisco Blanco-Vaca, Joan Carles Escolà-Gil.

Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 2005;25:e128-e132.

RESUM

L'EXPRESSIÓ DE L'APOLIPOPROTEÏNA A-II HUMANA NO INHIBEIX EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL DES DE MACRÒFAGS A FEMTES *IN VIVO*.

Introducció. L'expressió de l'apolipoproteïna apoA-II (apoA-II) humana en ratolins transgènics indueix una deficiència del colesterol de les lipoproteïnes d'elevada densitat (HDL) i incrementa la susceptibilitat a l'arteriosclerosi quan són alimentats amb una dieta rica en greixos i colesterol. Aquest fet pot ser causat, en part, per una reducció en el transport revers de colesterol (TRC). L'objectiu principal d'aquest estudi va ser determinar els efectes de l'expressió de l'apoA-II humana en ratolins transgènics sobre el TRC específic de macròfags *in vivo*.

Materials i mètodes. Es van injectar intraperitonealment macròfags P388D1 marcats amb ³H-colesterol en ratolins controls i ratolins transgènics d'apoA-II alimentats amb una dieta de manteniment o amb una dieta rica en greixos i colesterol. El plasma es va obtenir a les 24 i 48 hores, moment en el que els ratolins van ser sacrificats i el fetge i les femtes recollides.

Resultats. La concentració de ³H-colesterol en plasma dels ratolins transgènic d'apoA-II, tant a les 24 hores com a les 48 hores de l'injecció, no va diferir significativament respecte de la dels ratolins controls. En dieta de manteniment, el ³H-colesterol de fetge i femtes dels ratolins transgènics era 1,3 i 6 vegades més elevat, respectivament, que els dels ratolins controls. En canvi, amb la dieta rica en greixos no es van trobar diferències significatives en el ³H-colesterol de fetge i femtes.

Conclusions. Malgrat la deficiència d'HDL que presenten els ratolins transgènics d'apoA-II humana, el TRC des de macròfags a femtes *in vivo* funciona de forma efectiva. Els nostres resultats també suggereixen que l'augment de les lesions arterioscleròtiques trobades en els ratolins transgènics d'apoA-II alimentats amb dieta rica en greixos no són degudes al bloqueig del TRC específic de macròfags.

Tipus d'article: *rapid communication*

Factor d'impacte de la revista (segons *Journal Citation Reports* ® 2005): 7,053

Participació de l'autora d'aquesta tesi:

- Obtenció dels cultius cel·lulars
- Realització del transport revers específic de macròfags *in vivo*
- Realització d'anàlisis bioquímics i extraccions lipídiques
- Participació en la redacció dels Mètodes, Resultats i Discussió de l'article

**P.2 DIRECT EVIDENCE IN VIVO OF IMPAIRED
MACROPHAGE-SPECIFIC REVERSE CHOLESTEROL
TRANSPORT IN ATP-BINDING CASSETTE
TRANSPORTER A1-DEFICIENT MICE**

Laura Calpe-Berdiel, Noemí Rotllan, Xavier Palomer, Vicent Ribas, Francisco Blanco-Vaca, Joan Carles Escolà-Gil.

Biochimica et Biophysica Acta. 2005;1738:6-9.

RESUM

LA DEFICIÈNCIA DEL TRANSPORTADOR ABCA-1 DISMINUEIX EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL (TRC) ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS *IN VIVO*.

Introducció. El transportador *ATP-binding cassette A1* (ABCA-1) té una funció clau en el metabolisme de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL). Existeixen evidències que indiquen que l'ABCA-1 es rellevant en el TRC, especialment en el primer pas del TRC, és a dir, en el flux de colesterol des de macròfags. No obstant això, aquesta funció no ha estat mai demostrada *in vivo* ja que el transport hepatobiliar de colesterol no es va modificar en ratolins deficients en ABCA-1 (ABCA-1^{-/-}).

Materials i mètodes. Es van utilitzar macròfags peritoneals endògens marcats radioactivament amb colesterol tritiat i es van injectar en ratolins ABCA-1^{+/+}, ABCA-1^{+/-} i ABCA-1^{-/-} alimentats amb una dieta de manteniment. El plasma es va obtenir a les 24 i 48 hores, moment en el que els ratolins van ser sacrificats i el fetge i les femtes recollides.

Resultats. Es va observar una correlació directa entre la dosi gènica d'ABCA-1 i les concentracions plasmàtiques de ³H-colesterol a les 24 i 48 hores després de l'injecció. A les 48 hores de l'injecció, els ratolins ABCA-1^{-/-} presentaven una reducció significativa de 2,8 vegades en el ³H-colesterol hepàtic, de 1,7 vegades en la mucosa intestinal i de 2 vegades en les femtes.

Conclusions. Aquesta és la primera demostració quantitativa que el transportador ABCA-1 té una funció clau en el TRC específic de macròfags *in vivo*

Tipus d'article: *rapid report*

Factor d'impacte de la revista (segons *Journal Citation Reports* ® 2005): 2,751

Participació de l'autora d'aquesta tesi:

- Obtenció del cultius cel·lulars
- Realització del transport revers específic de macròfags *in vivo*
- Participació en la redacció dels Materials i mètodes de l'article

P.3 CETP ACTIVITY VARIATION IN MICE DOES NOT AFFECT TWO MAJOR HDL ANTIATHEROGENIC PROPERTIES: MACROPHAGE-SPECIFIC REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT AND LDL ANTIOXIDANT PROTECTION

Noemí Rotllan, Laura Calpe-Berdiel, Amy Guillaumet-Adkins, Songül Süren-Castillo, Francisco Blanco-Vaca, Joan Carles Escolà-Gil.

Atherosclerosis. 2008; Feb:196(2):505-13

RESUM

L'EXPRESSIÓ DE CETP EN RATOLINS TRANSGÈNICS NO AFECTA NI EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS NI A LES PROPIETATS ANTIOXIDANTS DE LES HDL.

Introducció. La proteïna transferidora d'èsters de colesterol (CETP) actua intercanviant èsters de colesterol per triglicèrids entre les partícules d'HDL i les lipoproteïnes que contenen apoB. Es desconeix l'impacte de la variació en l'activitat CETP sobre el TRC de macròfags i la capacitat antioxidant de les HDL. L'objectiu principal d'aquest estudi va ser determinar els efectes de l'expressió de CETP en ratolins transgènics sobre el TRC específic de macròfags i determinar l'habilitat protectora de l'HDL envers la modificació oxidativa de l'LDL.

Materials i mètodes. Es van injectar intraperitonealment macròfags P388D1 marcats amb ³H-colesterol en ratolins controls i ratolins transgènics de CETP alimentats amb una dieta de manteniment o amb una dieta rica en greixos. El plasma es va obtenir a les 24 i 48 hores, moment en el que els ratolins van ser sacrificats i el fetge i les femtes recollides. El grau de protecció davant la modificació oxidativa de l'LDL coincubada amb HDL va ser avaluada mesurant la mobilitat electroforètica de l'LDL i amb la monitorització de la fluorescència amb l'assaig del diacetato 2',7'-diclorofluoresceïna (DCF).

Resultats. En els ratolins transgènics de CETP es va observar una disminució de la quantitat de colesterol radioactiu d'HDL a les 24 i 48 hores de la injecció. No obstant això, no es van trobar diferències en la quantitat de ³H-colesterol en fetge i femtes entre els ratolins controls i transgènics en ambdues dietes. Les HDL dels ratolins transgènics de CETP i controls protegien a l'LDL de la modificació oxidativa de manera similar.

Conclusions. L'expressió de CETP en ratolins transgènics no afecta el TRC específic de macròfags a femtes *in vivo* ni a l'habilitat protectora de l'HDL envers la modificació oxidativa de l'LDL.

Tipus d'article: *research article*

Factor d'impacte de la revista (segons *Journal Citation Reports* ® 2007): 4,287

Participació de l'autora d'aquesta tesi:

- Obtenció del cultius cel·lulars
- Realització del transport revers específic de macròfags *in vivo*
- Realització d'anàlisis bioquímiques i extraccions lipídiques
- Obtenció de les fraccions lipoproteiques per FPLC i determinació de PON i PAF-AH
- Participació en la redacció de totes les parts de l'article

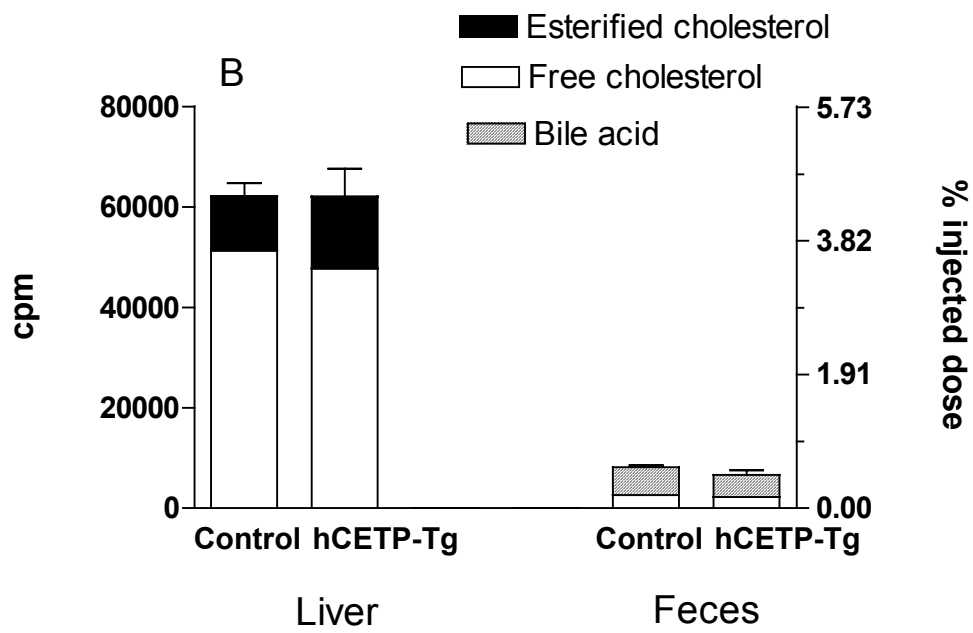
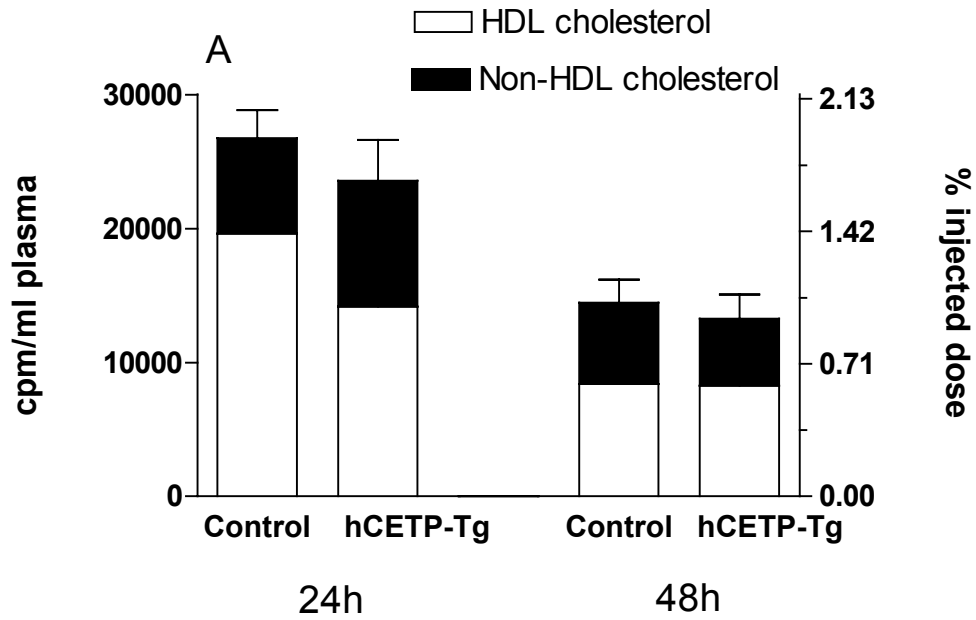
Table 1. Plasma lipid and fecal parameters and plasma activities of antioxidant enzymes in control and human CETP transgenic mice fed a chow diet for 3 months.

	Chow diet	
	Control (n =12)	Human CETP-Tg (n=6)
Weight (g)	23.6 ± 1.2	22.0 ± 1.3
Total cholesterol (mM)	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.2
HDL cholesterol (mM)	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.1*
Dietary cholesterol input (µmol/day)	4.9 ± 0.2	5.2 ± 0.2
Fecal cholesterol output (µmol/day)	3.5 ± 0.4	3.7 ± 0.3
Fecal bile acid output (µmol/day)	0.37 ± 0.04	0.25 ± 0.04
CETP activity (µM/ h)	< 10	183.1 ± 30
PON1 activity (µM/ min)	60.0 ± 2.9	60.6 ± 3.4
PAF-AH activity (µM/ min)	112.5 ± 6.4	98 ± 9.3
LDL relative electrophoretic mobility(%)	75 ± 5	64 ± 8

Relative electrophoretic mobility of human LDL after being exposed to oxidation coincubated with HDL from control and transgenic mice was determined using 2 independent experiments using pools of HDL obtained from 3 mice. Values are mean ± SEM. * P<0.05 vs. control.

Online Figure 1 legend. Macrophage-specific reverse cholesterol transport in human CETP-Tg mice. Eight Control C57BL/6 and six human (h) CETP-Tg mice maintained on a regular chow diet were injected intraperitoneally with [³H]cholesterol-labeled P388D1 mouse macrophages. Figure 1A: Plasma [³H]HDL and non-HDL cholesterol at 24 and 48 hours. Figure 1B: [³H]free and esterified cholesterol in liver and 48-hour feces and [³H]tracer from fecal bile acids.

On line Figure 1



**P.4 LIVER X RECEPTOR-MEDIATED ACTIVATION OF
REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT FROM
MACROPHAGES TO FECES IN VIVO REQUIRES ATP-
BINDING CASSETTE(ABC) G5/G8**

Laura Calpe-Berdiel, Noemí Rotllan (contributed equally that first author), Catherine Fievet, Rosa Roig, Francisco Blanco-Vaca, Joan Carles Escolà-Gil.

Journal of Lipid Research 2008 Sep; 49(9):1904-11

RESUM

L'EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS ABCG5 I ABCG8 ÉS NECESSÀRIA PEL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL DES DE MACRÒFAGS A FEMTES *IN VIVO* INDUÏT PER LXR

Introducció. Una de les propietats antiaterogèniques de l'HDL més important es el TRC, especialment des de macròfags, les cèl·lules que acumulen més colesterol en la formació de la placa ateromatosa. Els agonistes del receptor X de fetge (LXR) incrementen tant l'excreció d'esterols fecals com el TRC des de macròfags a femtes *in vivo*. Aquest receptor nuclear regula l'expressió de gens diana crítics en el TRC, com els transportadors ABCG5/G8. L'objectiu principal d'aquest estudi es determinar l'efecte dels transportadors ABCG5/G8 sobre el TRC des de macròfags a femtes *in vivo* induït per l'agonista de LXR.

Materials i mètodes. Per determinar el TRC específic de macròfags es van injectar intraperitonealment macròfags P388D1 marcats radioactivament amb ^3H -colesterol en ratolins controls ($G5G8^{+/+}$) i ratolins deficients del transportador ABCG5/G8 ($G5G8^{-/-}$) tractats amb l'agonista del LXR T0901317 o amb la solució vehicle. El plasma es va obtenir a les 24 i 48 hores, moment en el qual los ratolins van ser sacrificats i el fetge i las femtes recollides. Es va realitzar un altre experiment per estudiar l'excreció fecal de [^3H]-colesterol en aquests ratolins injectant-los intravenosament HDL marcada amb [^3H]-colesterol oleat.

Resultats. El tractament amb T0901317 va incrementar l'expressió en fetge de ABCG5/G8, fet que estava associat a un increment del doble en el [^3H]-colesterol derivat de macròfag que arribava a femtes en els ratolins $G5G8^{+/+}$. El TRC específic des de macròfags va ser similar en los $G5G8^{-/-}$ tractats amb la solució vehicle i amb T0901317. Després de la injecció de [^3H]-colesterol associat a HDL, es va observar un increment en la excreció fecal de [^3H]-colesterol degut a l'activació del LXR en els ratolins $G5G8^{+/+}$. En canvi, no es van trobar canvis en l'excreció fecal de [^3H]-colesterol en els ratolins $G5G8^{-/-}$ tractats amb la solució vehicle i tractats amb T0901317.

Conclusions. Aquest resultats demostren el paper clau dels transportadors ABCG5/G8 en el procés del TRC específic de macròfag induït per LXR.

Tipus d'article: *research paper*

Factor d'impacte de la revista (segons *Journal Citation Reports* ® 2007): 4,336

Participació de l'autora d'aquesta tesi:

- Obtenció del cultius cel·lulars
- Realització del transport revers específic de macròfags *in vivo*
- Anàlisi quantitativa per RT-PCR
- Participació en la redacció dels Materials i mètodes, Resultats i Discussió de l'article

R. RESUM GLOBAL

R.1 RESULTATS I DISCUSSIÓ

R.1.1. EFECTES DE L'APOA-II HUMANA SOBRE EL PERFIL LIPOPORTIEC I L'EXCRECIÓ FECAL DE LÍPIDS

Els ratolins transgènics d'apoA-II humana alimentats amb una dieta de manteniment presentaven una hipoalfalipoproteinèmia (veure Taula), tal i com ja s'havia descrit en altres estudis [232, 233]. Aquesta deficiència del colesterol d'HDL es deguda, en part, a la disminució de la concentració d'apoA-I com a conseqüència del desplaçament de l'apoA-I humana de les HDL que indueix l'apoA-II humana, i que al ser el cofactor més important de la LCAT, provoca en aquests ratolins una deficiència en l'activitat LCAT [56, 60, 232]. Els ratolins transgènics d'apoA-II humana alimentats amb una dieta rica en greixos presentaven una hipercolesterolèmia deguda a un increment en les partícules que contenen apoB (veure Taula) [58, 202].

D'altra banda, tant l'excreció de colesterol i àcids biliars en femtes, com l'absorció intestinal de colesterol dels ratolins transgènics no va diferir significativament de la dels ratolins controls (veure Taula). Cal dir però, que l'excreció fecal de colesterol, que té el seu origen en els macròfags, és mínima en comparació a aquella que prové dels teixits [234]. A més, els mecanismes moleculars que regulen el flux de colesterol en macròfags no tenen perquè ser iguals en altres teixits perifèrics. Els resultats de diversos estudis recents, demostren que la velocitat de l'excreció de colesterol hepatobiliar i fecal no té perquè reflectir el TRC específic de macròfags [21, 22]

R.1.2. EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS EN RATOLINS TRANSGÈNICS D'APOA-II ALIMENTATS AMB UNA DIETA DE MANTENIMENT

Es va determinar el TRC específic de macròfags mitjançant el seguiment de ³H-colesterol transportat des de macròfags P388D1 de ratolí a femtes *in vivo* en ratolins transgènics que hiperexpressen l'apoA-II humana alimentats amb dieta de manteniment.

La concentració de ³H-colesterol en plasma, tant a les 24h com a les 48h, no va diferir significativament de la dels ratolins controls (veure Figura 1A). Aproximadament el 70% del ³H-colesterol estava unit a l'HDL a les 24h en ambdós genotips, disminuint significativament a les 48h en els ratolins transgènics que hiperexpressen l'apoA-II

humana (35% *versus* 55% en els ratolins controls; veure Figura 1A). La major part del ³H-colesterol plasmàtic a les 24h estava esterificat en ambdós grups (66% i 67% en els ratolins controls i transgènics, respectivament). A les 48h, el ³H-colesterol plasmàtic esterificat era d'un 63% en els controls i d'un 58% en els ratolins transgènics, mentre que en fetge era, respectivament, 10,7% i 17,4% del ³H-colesterol total en fetge. Aquest fet pot ser degut a que el colesterol esterificat de les HDL és alliberat a la membrana dels hepatocits a través de SR-BI i aquest és hidrolitzat ràpidament per una lipasa específica [235, 236]. Al final del experiment, el ³H-colesterol total en fetge i femtes era 1,3 i 6 vegades més elevat en els ratolins transgènics que en els controls, respectivament (veure Figura 1B). No es van trobar diferències significatives en els ³H-àcids biliars de femtes (veure Figura 1B).

Cal destacar que els nostres ratolins transgènics d'apoA-II, tenen quantitats apreciables d'apoA-II no associada a lipoproteïnes, i s'ha descrit que aquesta indueix el flux de colesterol a través d'ABCA-1[59]. D'altra banda, aquests ratolins alimentats amb una dieta de manteniment, presenten un increment en la captura hepàtica de ³H-colesterol provinent d'HDL [233]. Per tant, aquests dos fets junts, és a dir, un increment en el flux de colesterol de macròfags i un increment en l'alliberament de colesterol a fetge per part de les HDL explicaria, en part, aquest increment en el contingut de ³H-colesterol hepàtic i fecal que es va observar. Tanmateix, la presència d'apoA-II humana en les partícules d'HDL incrementa la seva unió al receptor SR-BI, però la captació específica d'èsters de colesterol es troba disminuïda [65, 233]. Aquest fet suggereix que l'increment en la captura selectiva d'èsters de colesterol a nivell hepàtic es dona a través d'un mecanisme independent de receptor SR-BI [233, 237]. Cal destacar que s'ha observat la existència de mecanismes independents de SR-BI en la captació del colesterol de partícules d'HDL pobres en colesterol [238]. Per tant, és possible que l'existència d'aquestes vies independents del receptor SR-BI [239-241] puguin explicar aquest augment en la captació de colesterol per part de les HDL en fetge en aquests ratolins transgènics.

R.1.3. EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS EN RATOLINS TRANSGÈNICS D'APOA-II ALIMENTATS AMB UNA DIETA RICA EN GREIXOS

Es va determinar el TRC específic de macròfags mitjançant el seguiment de ^3H -colesterol transportat des de macròfags P388D1 de ratolí a femtes *in vivo* en ratolins transgènics que hipereexpressen l'apoA-II humana alimentats amb una dieta aterogènica.

La concentració de ^3H -colesterol en plasma, tant a les 24h com a les 48h, no va diferir significativament entre ambdós genotips (veure Figura 2A). A diferència dels resultats que havíem obtingut amb la dieta de manteniment, només el 30% aproximadament del ^3H -colesterol estava associat a l'HDL a les 24h en ambdós genotips. Tenint en compte que els ratolins no tenen activitat CETP, aquest increment en el ^3H -colesterol associat a les lipoproteïnes que contenen apoB podria ser degut a l'acció de la PLTP que intercanvia colesterol entre les HDL i les lipoproteïnes que contenen apoB [242], especialment en una situació on el contingut de lipoproteïnes que contenen apoB es troba incrementada en comparació amb una dieta de manteniment (veure Taula). Aquestes lipoproteïnes que contenen apoB són eliminades més ràpidament de la circulació i s'acumulen en el fetge. Aquest fet explicaria que el contingut de ^3H -colesterol en fetge d'aquests ratolins alimentats amb una dieta aterogènica estigui augmentat respecte els mateixos ratolins alimentats amb una dieta de manteniment. Amb tot, la quantitat de ^3H en fetge, femtes i àcids biliars en els ratolins transgènics no diferia significativament respecte els ratolins controls (veure Figura 2B).

Per tant, el TRC específic de macròfags a femtes no es trobava alterat en aquest ratolins transgènics d'apoA-II humana alimentats amb una dieta aterogènica, tot i que aquests ratolins presenten un increment en la captació d'èsters de colesterol derivats de partícules d'HDL en fetge i un increment en la susceptibilitat en l'arteriosclerosi [56, 233]. Es va repetir l'experiment amb ratolins transgènics, línia 25.3, que presenten una concentració d'apoA-II humana de 14mg/dL, després de 6 setmanes amb dieta aterogènica. Igualment, no es van trobar diferències significatives en el ^3H -colesterol en fetge entre ambdós genotips (24890 ± 942 i 23380 ± 1054 dpm, respectivament). Tampoc vam trobar diferències significatives en el contingut lipídic de les femtes (3146 ± 339 i 2557 ± 297 dpm, respectivament).

Cal destacar l'augment considerable en el marcatge radioactiu dels èsters de colesterol de fetge en els ratolins alimentats en dieta aterogènica en comparació als d'una dieta de manteniment (veure Figura 1 i 2). Aquest fet està associat amb un increment dramàtic en el contingut en fetge d'èsters de colesterol (aproximadament unes 25 i 30 vegades més en els ratolins controls i transgènics d'apoA-II humana, respectivament), que contrasta amb l'increment lleu de colesterol lliure en fetge (entre

1,5 i 2 vegades més en ambdós genotips) [58]. L'elevat contingut de colesterol i de colat de la dieta aterogènica indueix l'enzim acil-CoA:acil transferasa 1 (ACAT1), que és l'enzim limitant en l'esterificació del colesterol en el fetge [243]. Així, l'augment de la reesterificació en fetge del ^3H -colesterol lliure per part de l'ACAT1, seria una possible explicació d'aquestes observacions, així com també de la reducció comparativa en l'excreció de ^3H -colesterol derivat de macròfag a femtes dels ratolins alimentats en dieta aterogènica respecte del ^3H -colesterol en fetge.

En conclusió, aquest treball demostra que l'apoA-II manté el TRC des de macròfags a femtes *in vivo* malgrat la deficiència d'HDL. Aquest fet, conjuntament amb d'altres estudis, podria indicar que l'apoA-II podria exercir el seu efecte proaterogènic reduint les propietats antioxidants de l'HDL [201, 202], però no alterant el TRC específic de macròfag.

R.2 RESULTATS I DISCUSSIÓ

Després de tres mesos amb dieta de manteniment, els ratolins deficients del transportador ABCA-1 (ABCA1^{-/-}) presentaven una severa deficiència del colesterol d'HDL; els ratolins ABCA1^{+/-} presentaven una deficiència més moderada de colesterol d'HDL (veure Taula 1) [244]. Es va estudiar l'efecte de la disrupció d'ABCA-1 sobre el balanç net total de colesterol avaluant l'excreció de colesterol i d'àcids biliars en femtes. No es van trobar diferències significatives en els resultats de les dues anàlisis entre els ratolins ABCA1^{+/+}, ABCA1^{+/-} i ABCA1^{-/-} (veure Taula 1), indicant que el TRC total no sembla estar afectat per la deficiència d'ABCA-1. Aquestes dades concorden amb els resultats de Groen et al. que demostren que el transport hepatobiliar de colesterol no està alterat en els ratolins ABCA1^{-/-} [150]. Les causes d'aquest efecte són desconegudes, però podrien existir mecanismes que compensessin la pèrdua de colesterol mitjançada per HDL, tal i com un increment del colesterol provinent de les partícules que contenen apoB a través dels receptors de LDL (LDLr) i VLDL (LRP). Es va estudiar el paper del ABCA-1 en promoure el TRC específic de macròfag després d'injectar en ratolins ABCA1^{+/+}, ABCA1^{+/-} i ABCA1^{-/-} els seus propis macròfags peritoneals carregats de ³H-colesterol. La concentració de ³H-colesterol en plasma, tant a les 24h com a les 48h, estava reduïda en els ratolins ABCA1^{-/-} i ABCA1^{+/-}, 8 i 2 vegades, respectivament, en comparació amb la dels ratolins ABCA1^{+/+} (veure Figura 1A). Aquestes dades concorden amb estudis previs on el flux de colesterol *in vitro* en ratolins ABCA1^{-/-} estava alterat [245]. Aquesta reducció en la concentració de ³H-colesterol es dona majoritàriament en les partícules d'HDL (veure Figura 1A). Aquest fet posa de rellevància el paper crític del ABCA-1 en el TRC específic de macròfag, malgrat es coneixen altres vies a través de les quals té lloc el flux de colesterol [125, 126, 246].

El ³H-colesterol de fetge va disminuir 2,8 vegades en els ratolins ABCA1^{-/-} respecte els ratolins controls, però no va diferir significativament respecte els heterozigots (veure Figura 1B). Aquest fet podria ser degut, en part, a un increment en la taxa de recircularització de les partícules d'HDL en plasma [153].

Un estudi recent suggereix un paper important del intestí en l'excreció de colesterol a femtes, independentment de la excreció de colesterol biliar [27]. El fet que els ratolins ABCA1^{-/-} tinguin fins a 1,7 vegades menys ³H-colesterol lliure en l'intestí a les 48h podria suggerir la participació d'ABCA-1 en aquesta hipotètica via directa de TRC via intestí (veure Figura 1B). No obstant això, el transportador ABCA-1

s'expressa majoritàriament en la superfície basolateral de les cèl·lules intestinals [148, 247] i existeixen evidències que indiquen que el transportador ABCA-1 promou la secreció de colesterol en sentit contrari al lumen intestinal [247, 248]. Una explicació més simple de la reducció del ^3H -colesterol lliure en intestí seria que com que s'excreta menys ^3H -colesterol a femtes, aquest es reabsorbeix menys en intestí.

En conjunt, vam trobar una reducció significativa de ^3H -colesterol alliberat de macròfags a femtes, per tant podem afirmar que existeix un defecte significatiu en el TRC específic de macròfags en els ratolins ABCA1^{-/-} (veure Figura1C). Es pot observar també, una clara tendència a una disminució en el TRC específic de macròfags en els ratolins ABCA1^{+/-}, malgrat que aquesta no es significativa.

En conclusió, aquest treball demostra el paper clau del transportador ABCA-1 en el TRC específic de macròfags *in vivo*. Dos estudis recents han confirmat i ampliat els resultats del nostre estudi i han demostrat que la deficiència d'ABCA-1 en macròfags redueix el TRC de macròfags en ratolins ABCA1^{+/+} [125, 246]. Aquests fets també indiquen que el transportador ABCA-1 exerceix, en part, el seu efecte antiaterogènic promovent aquest TRC específic de macròfags [152, 249-251].

R.3 RESULTATS I DISCUSSIÓ

R.3.1. EFECTE DE LA CETP SOBRE EL PERFIL LIPOPORTIEC I L'EXCRECIÓ FECAL DE LÍPIDS

La CETP de *cyonolgus monkey* (macaco) té més d'un 95% d'homologia amb l'humana i la seva expressió indueix canvis en el metabolisme lipoproteic similars als que produeix la CETP humana [252]. En aquest estudi es van utilitzar ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco i ratolins que expressen la CETP humana i que presentaven aproximadament una activitat CETP en plasma unes 6,7 i 1,5 vegades, respectivament (veure Taula1 i Taula1 *Online*), més elevada que en humans normolipèmics, que presenten una activitat aproximada de 120µM/h [253].

Els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco alimentats amb una dieta de manteniment presentaven hipocolsterolèmia i hipoalfalipoproteinèmia, tal i com es descriu en altres estudis previs (veure Taula 1) [67, 68]. Aquests canvis també es donen, encara que, més moderadament en els ratolins que expressen la CETP humana (veure Taula 1 *Online*). No es van observar canvis en el colesterol d'HDL en els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco alimentats amb una dieta aterogènica (veure Taula1). Se sap que la CETP té un efecte moderat sobre la concentració de colesterol d'HDL en plasma de ratolins transgènics alimentats amb una dieta aterogènica que conté colat sòdic [58, 254], però es desconeixen les causes d'aquest efecte. Un possible mecanisme que contribuiria a aquest efecte podria ser que l'acumulació d'àcids biliars en el fetge d'aquests ratolins provoqués una disminució en la transcripció de la colesterol 7-alfa hidroxilasa [255] i això podria prevenir, en part, l'acció de la CETP sobre el colesterol d'HDL i l'excreció fecal d'àcids biliars [256]. Malgrat això, el colesterol de les VLDL i LDL estava augmentat en aquests mateixos ratolins (1,8 i 1,2 mM, respectivament), en comparació amb els ratolins controls (1,4 i 0,8 mM, respectivament).

No es van trobar diferències significatives entre el colesterol fecal i l'excreció d'àcids biliars dels ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco i els dels ratolins controls alimentats amb una dieta de manteniment (veure Taula 1). En canvi, els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco alimentats amb una dieta aterogènica, presentaven un increment significatiu en l'excreció de colesterol fecal. S'ha descrit que aquests ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco tenen una concentració de colesterol hepàtic incrementada en comparació als ratolins controls i també presenten

una major producció de VLDL [58]. Aquests canvis podrien ser deguts, en part, a un increment en la síntesi de colesterol *de novo*. També se sap que l'expressió de CETP en ratolins transgènics alimentats amb una dieta aterogènica incrementa l'excreció de colesterol biliar com a conseqüència, en part, de l'inducció dels transportadors ABCG5/G8 hepàtics [257].

R.3.2. L'EXPRESSIÓ DE CETP NO ALTERA EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS EN RATOLINS TRANSGÈNICS ALIMENTATS AMB UNA DIETA DE MANTENIMENT O AMB UNA DIETA RICA EN GREIXOS

Després de l'injecció intraperitoneal de macròfags P388D1 carregats de ³H-colesterol en els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco alimentats amb una dieta de manteniment, la concentració en plasma de ³H-colesterol va ser de fins a dues vegades inferior a la dels ratolins controls, tant a les 24h com a les 48h (veure Figura 1A). Aquesta reducció era deguda a una disminució del ³H-colesterol associat a HDL (veure Figura 1A). Aquesta reducció en la concentració del ³H-colesterol associat a HDL també es va donar, tant a les 24h com a les 48h, quan els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco eren alimentats amb una dieta aterogènica (veure Figura 1C). Malgrat això, el ³H-colesterol en plasma no diferia entre ambdós genotips a les 48h degut a un increment del ³H-colesterol associat a les lipoproteïnes que contenen apoB (veure Figura 1C).

Amb tot, la traça de ³H-colesterol en fetge, en femtes i en àcids biliars en els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco no va diferir significativament de la dels ratolins controls en cap de les dues dietes (veure Figura 1B i D). Tampoc, no es va observar cap canvi en el TRC dels ratolins que expressen la CETP humana respecte els ratolins controls alimentats amb una dieta de manteniment (veure Figura 1 Online).

Es va repetir aquest experiment en els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco alimentats amb dieta de manteniment i es van recollir les femtes durant 8 dies. La concentració en plasma de ³H-colesterol unit a HDL era més baixa a 5 i 8 dies en els ratolins transgènics (2214 ± 425 i 1172 ± 104 cpm/mL, *versus* 5576 ± 417 i 2244 ± 179 cpm/mL, respectivament, en els ratolins controls, $P < 0.05$). Tampoc no es van observar diferències en el contingut de ³H-colesterol en fetge i femtes ($16,351 \pm 645$ i 9918 ± 859 cpm, en els ratolins controls, *versus* $17,463 \pm 924$ i $12,041 \pm 1190$ cpm, respectivament, en els ratolins transgènics).

També es va realitzar un experiment de TRC independent, amb macròfags extrets del peritoneu dels propis ratolins. Les dades del flux del ^3H -colesterol, que prové dels macròfags del propi ratolí, a fetge i femtes va ser similar a aquell que presentaven els macròfags P388D1 de ratolí en el TRC en els ratolins controls i en els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco (veure Figura 1 i Taula 2).

Un fet sorprenent va ser la disminució en plasma de ^3H -colesterol associat a HDL provinent de macròfag que es va observar en els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco després de l'injecció intraperitoneal de macròfags carregats de ^3H -colesterol. Tanmateix, no es va observar cap canvi en la concentració de ^3H -colesterol associat a HDL en els ratolins controls els quals se'ls havia injectat macròfags peritoneals de ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco. Aquest fet és consistent amb l'absència d'efectes sobre el flux de colesterol que es dona en macròfags peritoneals que expressen la CETP humana [6, 258]. Prenent aquests resultats conjuntament, podem dir que l'expressió de CETP en macròfags sembla no afectar al flux de colesterol cap a plasma. Malgrat tot, i en concordança amb els nostres resultats, el plasma dels ratolins apoE-Leiden que expressen CETP no indueix correctament el flux de colesterol de cèl·lules Fu5AH que expressen SR-BI [258]. Semblaria doncs, que hi ha una menor eficiència per part de l'HDL dels ratolins que expressen la CETP en induir el flux de colesterol a través de SR-BI [258]. Malgrat tot, aquesta disminució en plasma de ^3H -colesterol associat a HDL provinent de macròfag que es va observar en els ratolins transgènics de CETP, no estava correlacionada amb una reducció del contingut de ^3H -colesterol en fetge i femtes.

Aquestes dades indiquen que la concentració plasmàtica de ^3H -colesterol derivat de macròfag no és per si mateixa un marcador del flux a través del compartiment plasmàtic i que la captació per part del fetge del ^3H -colesterol d'HDL i la seva excreció a la bilis té un efecte molt important sobre el TRC específic de macròfags [23, 24]. El procés de remodelació per part de la CETP sobre l'HDL s'ha vist que facilita l'entrada de colesterol de la partícula d'HDL a fetge [259, 260]. Per tant, una disminució del flux de colesterol des de macròfags i un increment en la captació de colesterol provinent de les HDL a fetge, podria explicar els nostres resultats en plasma i el TRC específic de macròfags inalterat.

En un estudi recent, s'ha descrit que en ratolins deficients d'apobec-1 que expressen la CETP hi ha un increment en el TRC específic de macròfags, malgrat que el ^3H associat a HDL també estava disminuït en aquests ratolins modificats genèticament

[261]. Les diferències entre aquest i el nostre treball poden ser degudes a la presència de lipoproteïnes que contenen únicament apoB-100 en els ratolins deficients d'apobec-1 i que són aclarides de la circulació més efectivament que les dels ratolins controls (en ratolins les lipoproteïnes tenen una gran proporció de apoB-48). A més, l'expressió de CETP normalitza el TRC en ratolins deficients de SR-BI en fettege, el qual es troba bloquejat en aquests ratolins [261]. Tanmateix, els resultats d'aquests treballs no explicarien l'increment en la susceptibilitat a l'arteriosclerosi dels ratolins que expressen la CETP alimentats amb una dieta aterogènica, o encruats amb ratolins deficients d'apoE i del receptor de LDL, i ratolins apoE-Leiden [58, 74-76, 258]. Aquest increment en l'arteriosclerosi d'aquests ratolins que expressen la CETP coincideix amb una redistribució significativa del colesterol d'HDL cap a les lipoproteïnes que contenen apoB [58, 74-76, 258].

R.3.3. L'EXPRESSIÓ DE CETP NO ALTERA LA CAPACITAT DE LES HDL D'INHIBIR LA MODIFICACIÓ OXIDATIVA DE L'LDL

L'oxidació de les LDL altera la seva migració electroforètica i les HDL poden prevenir, en part, l'oxidació de les LDL i el seu patró diferencial de migració [202].

Es va estudiar la migració electroforètica d'LDL humana coincubada amb HDL sota condicions oxidatives (veure Figura 2). Tant les HDL dels ratolins controls com la dels ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco prevenen la migració electroforètica de l'LDL (veure Figura 2A). També es van obtenir resultats similars quan es va utilitzar l'HDL de ratolins que expressen la CETP humana (veure Taula 1 Online). Un altre experiment que es va dur a terme va ser el de coincubar LDL humana amb HDL de ratolí i mesurar la fluorescència del diacetat de 2',7'-diclorfluoresceïna (DCF), compost que reacciona emeten fluorescència al reaccionar amb espècies reactives del oxigen. Es va observar que les HDL d'ambdós genotips tenen la mateixa capacitat d'impedir l'increment en la fluorescència del DCF (veure Figura 2B).

R.3.4. ACTIVITAT EN PLASMA D'ENZIMS ASSOCIATS A L'HDL INVOLUCRATS EN LA PROTECCIÓ ANTIOXIDATIVA DE LDL

Les activitats LCAT exògena, PON-1 i PAF-AH no van diferir entre ambdós genotips i en cap de les dues dietes (veure Taula 1 i Taula 1 *Online*).

Les activitats d'aquests enzims també es van determinar en la fracció d'HDL aïllada per cromatografia líquida de proteïnes (FPLC) i per ultracentrifugació. Les

activitats PON-1 i PAF-AH associades a HDL no es van veure modificades per l'expressió de CETP en ratolins en cap de les dues dietes (veure Figura 3). L'activitat PON-1 respecte la concentració de proteïna de l'HDL en els ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco va ser similar a la dels ratolins controls ($36,5 \pm 2,1 \mu\text{mol/g min}$ *versus* $29,2 \pm 8,9 \mu\text{mol/g min}$ en ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco i en ratolins controls, respectivament, alimentats en dieta de manteniment, i $10,7 \pm 1,5 \mu\text{mol/g min}$ *versus* $13,6 \pm 2,7 \mu\text{mol/g min}$ en ratolins que hiperexpressen la CETP de macaco i en ratolins controls alimentats en una dieta aterogènica, respectivament). Cal dir, que en el procés d'ultracentrifugació, la PAF-AH s'allibera de l'HDL.

Els nostres resultats demostren que la expressió de la CETP no afecta ni a la protecció de l'HDL de la modificació oxidativa de LDL, ni a l'activitat dels principals enzims antioxidants. Resultats que concorden amb un estudi on es va trobar una concentració normal de anticossos de LDL oxidada en ratolins que hiperexpressen la CETP [254]. En un altre estudi en pacients amb hipoalfalipoproteinèmia que reben un tractament inhibitori de la CETP s'ha descrit una reducció en la concentració dels anticossos de LDL oxidada i un increment en l'activitat PON-1 [229]. Tanmateix, aquest fet no s'observa consistentment en pacients deficients de CETP [228, 262].

R.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

R.4.1. LA DEFICIÈNCIA DEL TRANSPORTADOR ABCG5/G8 NO ALTERA EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL DES DE MACRÒFAGS A FEMTES EN RATOLINS

Es va determinar el TRC específic de macròfags mitjançant el seguiment de ^3H -colesterol transportat des de macròfags P388D1 de ratolí a femtes *in vivo* en ratolins deficients del transportador ABCG5/G8 ($G5G8^{-/-}$). Sorprenentment, la concentració en plasma del colesterol d'HDL marcat radioactivament en els ratolins $G5G8^{-/-}$ a les 24 hores era significativament més elevada respecte dels ratolins $G5G8^{+/+}$ (veure Figura 1A). Aquest fet podria ser degut a un increment del flux de colesterol i a una disminució del catabolisme; les partícules d'HDL en els ratolins $G5G8^{-/-}$ transporten quantitats importants d'esterols vegetals i són més grans i, per tant, podrien ser millors acceptores de colesterol; d'altra banda, el colesterol esterificat d'aquestes HDL podria ser captat selectivament a nivell hepàtic pitjor que el dels ratolins $G5G8^{+/+}$ [263]. La quantitat de ^3H -colesterol detectada en fetge i en femtes en els ratolins $G5G8^{-/-}$ no va diferir respecte de la dels ratolins $G5G8^{+/+}$ (veure Figura 1B i C). Aquests resultats són sorprenents ja que els ratolins $G5G8^{-/-}$ presentaven una reducció del 20-40% en la excreció fecal de esterols neutres (veure Taula 2) i l'excreció biliar de colesterol està severament reduïda en aquest ratolins *knockout* [170, 264]. Tal i com s'ha comentat en el primer article, la velocitat de l'excreció de colesterol hepatobiliar i fecal no té perquè reflectir el TRC específic de macròfags [21, 22]. Dades recents han suggerit un paper determinant de l'intestí en l'excreció de colesterol del plasma a la llum intestinal i femtes [27]. És possible que l'intestí pugui promoure un transport directe del ^3H -colesterol de les partícules d'HDL al enteròcit a través d'una via independent de ABCG5/G8, que expliqués, en part, un TRC específic de macròfags a femtes inalterat en els ratolins $G5G8^{-/-}$.

R.4.2. EL TRANSPORTADOR ABCG5/G8 ÉS NECESSARI PER LA INDUCCIÓ DEL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL ESPECÍFIC DE MACRÒFAGS A TRAVÉS DE L'ACTIVACIÓ DE LXR

En l'estudi bioquímic del plasma, del fetge i de les femtes realitzat en els ratolins $G5G8^{+/+}$ i $G5G8^{-/-}$ tractats amb la solució vehicle o amb l'agonista T0901317, es van obtenir resultats semblants als obtinguts prèviament en un altre estudi [166]. En els

ratolins G5G8^{+/+} tractats amb l'agonista T0901317 es va observar un increment en la concentració de colesterol d'HDL en plasma (veure Taula 1) i una disminució en la concentració de colesterol en fetge (veure Taula 2). Aquest fet és concomitant amb la inducció de l'excreció de colesterol fecal que observem en els ratolins G5G8^{+/+} tractats amb l'agonista T0901317, però no en els ratolins G5G8^{-/-} (Taula 2).

En un experiment independent es va determinar el TRC específic de macròfags mitjançant el seguiment de ³H-colesterol transportat des de macròfags P388D1 de ratolí a femtes *in vivo* en ratolins G5G8^{+/+} i G5G8^{-/-} tractats amb o sense agonista de LXR. Es va observar que el tractament amb l'agonista T0901317 no alterava la concentració de ³H-colesterol en plasma ni a les 24h ni a les 48h en cap dels dos genotips (veure Figura 2A). Tampoc es van observar canvis en fetge (veure Figura 2B). En canvi, la quantitat de ³H-colesterol fecal en ratolins G5G8^{+/+} va ser el doble en els tractats amb l'agonista T0901317 respecte els tractats amb la solució vehicle, mentre que en els ratolins G5G8^{-/-} no es van observar diferències significatives en funció del tractament (veure Figura 2C). Aquests resultats demostren que l'expressió d'ABCG5/G8 és necessària per la inducció mitjançada per LXR del TRC específic de macròfags.

És important destacar que els canvis en el ³H-colesterol derivat de macròfags en plasma, HDL i fetge no es correlacionen amb la massa de colesterol total. Per tant, els nostres resultats indiquen que un cop a tingut lloc el flux de colesterol radioactiu des dels macròfags a plasma i fetge, aquest no sembla estar influït per la massa de colesterol de plasma total, d'HDL i de fetge. A més, la síntesi endògena de colesterol en fetge està severament reduïda en ratolins G5G8^{-/-} com a conseqüència de la acumulació d'estigmasterol que provoca una fragmentació de SREBP2 [265]. Creiem doncs que el ³H-colesterol traça el camí de la massa de colesterol derivat de macròfag, i, per tant, les nostres conclusions estan només basades en la determinació de ³H-colesterol.

Amb l'objectiu de determinar l'origen del ³H-colesterol fecal en aquests ratolins, es van injectar intravenosament partícules d'HDL en les quals s'havia incorporat ³H-colesterol esterificat. Es va observar un catabolisme significativament més lent en els ratolins G5G8^{+/+} tractats amb l'agonista T0901317 respecte els tractats amb la solució vehicle (veure Figura 3A). Les causes d'aquest efecte es desconeixen, però podria ser degut a un increment en la mida de la partícula d'HDL deguda a l'activació de LXR [266], i que podria reduir, en part, la captura selectiva de colesterol per part del fetge [263]. Tanmateix, aquests mateixos ratolins presentaven un increment en l'excreció de ³H-colesterol fecal derivat de macròfag (veure Figura 3B). En canvi, en els ratolins

G5G8^{-/-}, no es van observar canvis en l'excreció fecal de ³H-colesterol tant si rebien el tractament de l'agonista de LXR com si no (veure Figura 3B).

R.4.3 EFECTES DEL AGONISTA DE LXR EN L'INTESTÍ I EN FETGE SOBRE L'EXPRESSIÓ DE GENS RELACIONATS AMB EL TRANSPORT REVERS DE COLESTEROL EN RATOLINS G5/G8^{+/+} I G5G8^{-/-}

El patró d'expressió de gens induïts pel tractament del agonista de LXR en els ratolins G5G8^{+/+} va ser en general similar al que s'ha publicat en altres estudis [26, 166]. L'expressió de RNAm del transportador ABCG5/G8 en fetge es trobava augmentada després del tractament amb l'agonista de LXR en els ratolins G5G8^{+/+} (veure Figura 4B). L'expressió de RNAm del transportador ABCG5/G8 en intestí en els ratolins G5G8^{+/+} tractats amb l'agonista de LXR estava incrementada (concretament 1,5 vegades) malgrat que aquesta diferència no era estadísticament significativa respecte els ratolins G5G8^{+/+} tractats amb la solució vehicle (veure Figura 4A). El tractament amb l'agonista T0901317 també estava associat a increments significatius en l'expressió de RNAm de SREBP-1c en intestí i de CYP7A-1 en fetge en els ratolins G5G8^{+/+}. Tanmateix, no hi va haver canvis significatius en l'expressió d'ambdós gens en els ratolins G5G8^{-/-} tractats amb l'agonista de LXR. Cal tenir en compte que l'acumulació d'alguns esterols vegetals en aquest model de ratolí pot activar LXR α [164], i això podria explicar l'expressió normal o fins i tot augmentada d'alguns gens diana de LXR en els nostres ratolins G5G8^{-/-}. Com per exemple, en el cas de l'increment en l'expressió de CYP7A-1 en ratolins G5G8^{-/-} tractats amb solució vehicle en comparació amb els ratolins G5G8^{+/+}; aquest fet podria impedir parcialment l'augment de l'expressió de CYP7A-1 en els ratolins G5G8^{-/-} tractats amb l'agonista de LXR.

En qualsevol cas, el tractament amb l'agonista T0901317 no afecta a l'excreció fecal d'àcids biliars en ambdós genotips, malgrat la regulació a l'alta del CYP7A-1 en fetge en els ratolins G5G8^{+/+} tractats amb l'agonista de LXR. Aquestes dades coincideixen amb un altre estudi en ratolins C57BL/6 i en ratolins transgènics apoB/CETP tractats amb un altre agonista de LXR, el GW3965, en què no es veien canvis en l'excreció fecal de ³H-àcids biliars malgrat l'increment en el ³H-colesterol fecal provinent de macròfag [26]. Un dels possibles mecanismes que podria contribuir a aquest efecte seria l'elevada taxa de recirculació dels àcids biliars en aquests ratolins [173].

En conclusió, els nostres resultats demostren la importància del transportador ABCG5/G8 en el TRC específic de macròfags a femtes *in vivo* induït per l'agonista LXR i donen suport a la hipòtesi que aquests transportadors juguen un paper determinant en la fase final d'aquesta via. Aquest resultat també suggereixen que una hiperexpressió de ABCG5/G8 també podria ser una bona estratègia per incrementar el TRC específic de macròfags i reduir l'arteriosclerosi [267, 268].

C. CONCLUSIONS

1. La hiperexpressió d'apoA-II humana en ratolins transgènics no inhibeix el transport revers de colesterol (TRC) des de macròfags a femtes *in vivo* malgrat la deficiència del colesterol d'HDL que indueix. En canvi, els resultats presentats suggereixen que l'apoA-II podria exercir el seu efecte proaterogènic reduint les propietats antioxidants de l'HDL.
2. La deficiència del transportador ABCA-1 en ratolins *knockout* redueix el TRC específic de macròfags *in vivo*. Aquest resultat demostra la importància d'ABCA-1 en aquesta funció antiaterogènica de les HDL i, demostra la possible relació entre la disminució del TRC dependent de macròfags i l'augment de la susceptibilitat a l'arteriosclerosi.
3. L'expressió de CETP de macaco o humana en ratolins transgènics no afecta al TRC específic de macròfags *in vivo* ni les propietats antioxidants de l'HDL. L'efecte proaterogènic de l'expressió de CETP en ratolins sembla doncs degut a mecanismes independents d'aquestes dues funcions antiaterogèniques de les HDL.
4. La deficiència del transportador ABCG5/G8 en ratolins *knockout* no altera el TRC des de macròfags a femtes *in vivo*. Tanmateix, l'expressió ABCG5/G8 és necessària per a la inducció del TRC específic de macròfags induït pels agonistes de LXR. Els nostres resultats donen suport a la hipòtesi que aquests transportadors tenen un paper determinant en la fase final d'aquesta via i els confirmen com a dianes moleculars de gran interès per a prevenir o tractar l'arteriosclerosi.

Conclusions

B. BIBLIOGRAFIA

1. Skinner, E.R., *High-density lipoprotein subclasses*. *Curr Opin Lipidol*, 1994. **5**(3): p. 241-7.
2. Navab, M., et al., *Mechanisms of disease: proatherogenic HDL--an evolving field*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2006. **2**(9): p. 504-11.
3. Lund-Katz, S., et al., *High density lipoprotein structure*. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. d1044-54.
4. Huang, Y., et al., *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**(5): p. 1834-8.
5. Francone, O.L., A. Gurakar, and C. Fielding, *Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(12): p. 7066-72.
6. Rader, D.J., *Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(12): p. 3090-100.
7. Cheung, M.C. and J.J. Albers, *Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II*. *J Biol Chem*, 1984. **259**(19): p. 12201-9.
8. von Eckardstein, A., et al., *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**(10): p. 1755-63.
9. Czarnecka, H. and S. Yokoyama, *Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(4): p. 2023-8.
10. Heizmann, C., et al., *DNA polymorphism haplotypes of the human lipoprotein lipase gene: possible association with high density lipoprotein levels*. *Hum Genet*, 1991. **86**(6): p. 578-84.
11. Hammad, S.M., et al., *Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(18): p. 10158-63.
12. Kozyraki, R., et al., *The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein*. *Nat Med*, 1999. **5**(6): p. 656-61.
13. Rye, K.A. and P.J. Barter, *Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(3): p. 421-8.
14. von Eckardstein, A., J.R. Nofer, and G. Assmann, *High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(1): p. 13-27.
15. Osono, Y., et al., *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**(9): p. 4114-9.
16. Alam, K., R.S. Meidell, and D.K. Spady, *Effect of up-regulating individual steps in the reverse cholesterol transport pathway on reverse cholesterol transport in normolipidemic mice*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(19): p. 15641-9.
17. Jolley, C.D., et al., *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**(11): p. 2143-9.

18. Angelin, B., P. Parini, and M. Eriksson, *Reverse cholesterol transport in man: promotion of fecal steroid excretion by infusion of reconstituted HDL*. *Atheroscler Suppl*, 2002. **3**(4): p. 23-30.
19. Stein, O. and Y. Stein, *Atheroprotective mechanisms of HDL*. *Atherosclerosis*, 1999. **144**(2): p. 285-301.
20. Tall, A.R., N. Wang, and P. Mucksavage, *Is it time to modify the reverse cholesterol transport model?* *J Clin Invest*, 2001. **108**(9): p. 1273-5.
21. Zhang, Y., et al., *Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo*. *Circulation*, 2003. **108**(6): p. 661-3.
22. Moore, R.E., et al., *Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired reverse cholesterol transport and increased inflammation*. *Circ Res*, 2005. **97**(8): p. 763-71.
23. Zhang, Y., et al., *Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(10): p. 2870-2874.
24. Rotllan, N., et al., *Overexpression of human apolipoprotein A-II in transgenic mice does not impair macrophage-specific reverse cholesterol transport in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(9): p. e128-32.
25. Calpe-Berdiel, L., et al., *Direct evidence in vivo of impaired macrophage-specific reverse cholesterol transport in ATP-binding cassette transporter A1-deficient mice*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1738**(1-3): p. 6-9.
26. Naik, S.U., et al., *Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo*. *Circulation*, 2006. **113**(1): p. 90-7.
27. Kruit, J.K., et al., *Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(1): p. 147-56.
28. Rubin, E.M., et al., *Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI*. *Nature*, 1991. **353**(6341): p. 265-7.
29. Plump, A.S., C.J. Scott, and J.L. Breslow, *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**(20): p. 9607-11.
30. Paszty, C., et al., *Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(2): p. 899-903.
31. Benoit, P., et al., *Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models*. *Circulation*, 1999. **99**(1): p. 105-10.
32. Tangirala, R.K., et al., *Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice*. *Circulation*, 1999. **100**(17): p. 1816-22.
33. Chiesa, G., et al., *Human apolipoproteins A-I and A-II in cell cholesterol efflux: studies with transgenic mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(9): p. 1417-23.
34. Stein, O., et al., *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**(2): p. 367-74.
35. Navab, M., et al., *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**(3): p. 290-2.
 36. Garber, D.W., et al., *A new synthetic class A amphipathic peptide analogue protects mice from diet-induced atherosclerosis*. J Lipid Res, 2001. **42**(4): p. 545-52.
 37. Navab, M., et al., *Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice*. Circulation, 2004. **109**(25): p. 3215-20.
 38. Wang, N., et al., *A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I*. J Clin Invest, 2003. **111**(1): p. 99-107.
 39. Li, H., R.L. Reddick, and N. Maeda, *Lack of apoA-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice*. Arterioscler Thromb, 1993. **13**(12): p. 1814-21.
 40. Voyiaziakis, E., et al., *ApoA-I deficiency causes both hypertriglyceridemia and increased atherosclerosis in human apoB transgenic mice*. J Lipid Res, 1998. **39**(2): p. 313-21.
 41. Moore, R.E., et al., *Apolipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(10): p. 1914-20.
 42. Stein, O., et al., *Delayed loss of cholesterol from a localized lipoprotein depot in apolipoprotein A-I-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9820-4.
 43. Jolley, C.D., J.M. Dietschy, and S.D. Turley, *Induction of bile acid synthesis by cholesterol and cholestyramine feeding is unimpaired in mice deficient in apolipoprotein AI*. Hepatology, 2000. **32**(6): p. 1309-16.
 44. Sirtori, C.R., et al., *Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study*. Circulation, 2001. **103**(15): p. 1949-54.
 45. Weisgraber, K.H., et al., *A-Imilano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins*. J Clin Invest, 1980. **66**(5): p. 901-7.
 46. Franceschini, G., et al., *Increased cholesterol efflux potential of sera from ApoA-IMilano carriers and transgenic mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1257-62.
 47. Shah, P.K., et al., *Effects of recombinant apolipoprotein A-I(Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 1998. **97**(8): p. 780-5.
 48. Shah, P.K., et al., *High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization*. Circulation, 2001. **103**(25): p. 3047-50.
 49. Kaul, S., et al., *Rapid reversal of endothelial dysfunction in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice by recombinant apolipoprotein A-I(Milano)-phospholipid complex*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(6): p. 1311-9.

50. Nissen, S.E., et al., *Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial*. *Jama*, 2003. **290**(17): p. 2292-300.
51. Tailleux, A., et al., *Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2002. **164**(1): p. 1-13.
52. Kalopissis, A.D., D. Pastier, and J. Chambaz, *Apolipoprotein A-II: beyond genetic associations with lipid disorders and insulin resistance*. *Curr Opin Lipidol*, 2003. **14**(2): p. 165-72.
53. Martin-Campos, J.M., et al., *Apolipoprotein A-II, genetic variation on chromosome 1q21-q24, and disease susceptibility*. *Curr Opin Lipidol*, 2004. **15**(3): p. 247-53.
54. Blanco-Vaca, F., et al., *Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein*. *J Lipid Res*, 2001. **42**(11): p. 1727-39.
55. Warden, C.H., et al., *Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II*. *Science*, 1993. **261**(5120): p. 469-72.
56. Escola-Gil, J.C., et al., *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**(2): p. 457-62.
57. Escola-Gil, J.C., et al., *Expression of human apolipoprotein A-II in apolipoprotein E-deficient mice induces features of familial combined hyperlipidemia*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(8): p. 1328-38.
58. Escola-Gil, J.C., et al., *ApoA-II expression in CETP transgenic mice increases VLDL production and impairs VLDL clearance*. *J Lipid Res*, 2001. **42**(2): p. 241-8.
59. Fournier, N., et al., *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**(4): p. 638-43.
60. Julve-Gil, J., et al., *Free cholesterol deposition in the cornea of human apolipoprotein A-II transgenic mice with functional lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency*. *Metabolism*, 1999. **48**(4): p. 415-21.
61. Tailleux, A., et al., *Decreased susceptibility to diet-induced atherosclerosis in human apolipoprotein A-II transgenic mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(11): p. 2453-8.
62. Rinninger, F., et al., *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**(1): p. 31-40.
63. de Beer, M.C., et al., *Apolipoprotein A-II modulates the binding and selective lipid uptake of reconstituted high density lipoprotein by scavenger receptor BI*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(19): p. 15832-9.
64. Pilon, A., et al., *Apolipoprotein AII enrichment of HDL enhances their affinity for class B type I scavenger receptor but inhibits specific cholesteryl ester uptake*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(4): p. 1074-81.
65. de Beer, M.C., et al., *ApoA-II modulates the association of HDL with class B scavenger receptors SR-BI and CD36*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(4): p. 706-15.
66. Tall, A.R., *Plasma cholesteryl ester transfer protein*. *J Lipid Res*, 1993. **34**(8): p. 1255-74.

67. Agellon, L.B., et al., *Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 10796-801.
68. Marotti, K.R., et al., *The role of cholesteryl ester transfer protein in primate apolipoprotein A-I metabolism. Insights from studies with transgenic mice*. Arterioscler Thromb, 1992. **12**(6): p. 736-44.
69. Melchior, G.W., et al., *Apolipoprotein A-I metabolism in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. Insights into the mechanisms responsible for low plasma high density lipoprotein levels*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8044-51.
70. Francone, O.L., L. Royer, and M. Haghpassand, *Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes*. J Lipid Res, 1996. **37**(6): p. 1268-77.
71. Jiang, X.C., et al., *Down-regulation of mRNA for the low density lipoprotein receptor in transgenic mice containing the gene for human cholesteryl ester transfer protein. Mechanism to explain accumulation of lipoprotein B particles*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 27406-12.
72. Stein, O., et al., *Reverse cholesterol transport in mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein*. Atherosclerosis, 2002. **164**(1): p. 73-8.
73. de Grooth, G.J., et al., *A review of CETP and its relation to atherosclerosis*. J Lipid Res, 2004. **45**(11): p. 1967-74.
74. Marotti, K.R., et al., *Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein*. Nature, 1993. **364**(6432): p. 73-5.
75. Hayek, T., et al., *Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 2071-4.
76. Plump, A.S., et al., *Increased atherosclerosis in ApoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(4): p. 1105-10.
77. Foger, B., et al., *Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 36912-20.
78. MacLean, P.S., et al., *Cholesteryl ester transfer protein expression prevents diet-induced atherosclerotic lesions in male db/db mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(8): p. 1412-5.
79. Harder, C., et al., *Cholesteryl ester transfer protein (CETP) expression protects against diet induced atherosclerosis in SR-BI deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 858-64.
80. Linsel-Nitschke, P. and A.R. Tall, *HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(3): p. 193-205.
81. Curb, J.D., et al., *A prospective study of HDL-C and cholesteryl ester transfer protein gene mutations and the risk of coronary heart disease in the elderly*. J Lipid Res, 2004. **45**(5): p. 948-53.
82. Stein, O. and Y. Stein, *Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2005. **178**(2): p. 217-30.

83. Brousseau, M.E., et al., *Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol*. N Engl J Med, 2004. **350**(15): p. 1505-15.
84. Barter, P.J., et al., *Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events*. N Engl J Med, 2007. **357**(21): p. 2109-22.
85. Tall, A.R., L. Yvan-Charvet, and N. Wang, *The failure of torcetrapib: was it the molecule or the mechanism?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 257-60.
86. Rader, D.J., *Illuminating HDL -- Is It Still a Viable Therapeutic Target?* N Engl J Med, 2007.
87. de Grooth, G.J., et al., *Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose-response study*. Circulation, 2002. **105**(18): p. 2159-65.
88. Okamoto, H., et al., *A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits*. Nature, 2000. **406**(6792): p. 203-7.
89. Santamarina-Fojo, S., et al., *Lecithin-cholesterol acyltransferase: role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2000. **11**(3): p. 267-75.
90. Hovingh, G.K., et al., *Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2005. **16**(2): p. 139-45.
91. Zhang, A.H., et al., *Increased plasma HDL cholesterol levels and biliary cholesterol excretion in hamster by LCAT overexpression*. FEBS Lett, 2004. **570**(1-3): p. 25-9.
92. Berard, A.M., et al., *High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesteryl acyltransferase*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 744-9.
93. Mehlum, A., et al., *Mice overexpressing human lecithin: cholesterol acyltransferase are not protected against diet-induced atherosclerosis*. Apmis, 1997. **105**(11): p. 861-8.
94. Furbee, J.W., Jr. and J.S. Parks, *Transgenic overexpression of human lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) in mice does not increase aortic cholesterol deposition*. Atherosclerosis, 2002. **165**(1): p. 89-100.
95. Lambert, G., et al., *Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15090-8.
96. Furbee, J.W., Jr., J.K. Sawyer, and J.S. Parks, *Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency increases atherosclerosis in the low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E knockout mice*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3511-9.
97. Ng, D.S., et al., *Oxidative stress is markedly elevated in lecithin:cholesterol acyltransferase-deficient mice and is paradoxically reversed in the apolipoprotein E knockout background in association with a reduction in atherosclerosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 11715-20.
98. Acton, S., et al., *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science, 1996. **271**(5248): p. 518-20.
99. Glass, C., et al., *Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(17): p. 5435-9.

100. Trigatti, B.L., M. Krieger, and A. Rigotti, *Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(10): p. 1732-8.
101. Rigotti, A., et al., *Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein*. *Curr Opin Lipidol*, 1997. **8**(3): p. 181-8.
102. Cao, G., et al., *Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-I. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 33068-76.
103. Wang, N., et al., *Scavenger receptor BI (SR-BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores. In vivo evidence that SR-BI is a functional high density lipoprotein receptor under feedback control*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(35): p. 21001-4.
104. Krieger, M., *Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 523-58.
105. Trigatti, B., S. Covey, and A. Rizvi, *Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 1): p. 116-20.
106. Van Eck, M., et al., *Scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter AI in reverse cholesterol transport and atherosclerosis*. *Curr Opin Lipidol*, 2005. **16**(3): p. 307-15.
107. Varban, M.L., et al., *Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(8): p. 4619-24.
108. Rigotti, A., et al., *A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(23): p. 12610-5.
109. Trigatti, B., et al., *Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(16): p. 9322-7.
110. Wang, D.Q. and M.C. Carey, *Susceptibility to murine cholesterol gallstone formation is not affected by partial disruption of the HDL receptor SR-BI*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1583**(2): p. 141-50.
111. Mardones, P., et al., *Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice*. *J Lipid Res*, 2001. **42**(2): p. 170-80.
112. Wang, N., et al., *Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(49): p. 32920-6.
113. Kozarsky, K.F., et al., *Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels*. *Nature*, 1997. **387**(6631): p. 414-7.
114. Ueda, Y., et al., *Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(11): p. 7165-71.

115. Ji, Y., et al., *Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33398-402.
116. Sehayek, E., et al., *Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 10194-9.
117. Out, R., et al., *Scavenger receptor BI plays a role in facilitating chylomicron metabolism*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18401-6.
118. Out, R., et al., *Adenovirus-mediated hepatic overexpression of scavenger receptor class B type I accelerates chylomicron metabolism in C57BL/6J mice*. J Lipid Res, 2005. **46**(6): p. 1172-81.
119. Arai, T., et al., *Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2366-71.
120. Kozarsky, K.F., et al., *Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(3): p. 721-7.
121. Ueda, Y., et al., *Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20368-73.
122. Braun, A., et al., *Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 270-6.
123. Covey, S.D., et al., *Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1589-94.
124. Yancey, P.G., et al., *High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36596-604.
125. Wang, X., et al., *Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2216-24.
126. Escola-Gil, J.C., et al., *Antiatherogenic role of high-density lipoproteins: insights from genetically engineered-mice*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 1328-48.
127. Van Eck, M., et al., *Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development*. Am J Pathol, 2004. **165**(3): p. 785-94.
128. Cai, L., et al., *Serum amyloid A is a ligand for scavenger receptor class B type I and inhibits high density lipoprotein binding and selective lipid uptake*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2954-61.
129. Higgins, C., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 67-113.
130. Stefkova R, P.R., Hubacek JA, *ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Human Metabolism and Diseases*. Physiol Res, 2004. **53**: p. 235-243.

131. Lehmann, J.M., et al., *Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3137-40.
132. Repa, J.J., et al., *Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1524-9.
133. Repa, J.J., et al., *Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18793-800.
134. Costet, P., et al., *Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 28240-5.
135. Chen, J.Y., et al., *Mice expressing the human CYP7A1 gene in the mouse CYP7A1 knock-out background lack induction of CYP7A1 expression by cholesterol feeding and have increased hypercholesterolemia when fed a high fat diet*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42588-95.
136. Wang, N., et al., *LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(6): p. 1310-6.
137. Repa, J.J. and D.J. Mangelsdorf, *The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1243-8.
138. Terasaka, N., et al., *T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. FEBS Lett, 2003. **536**(1-3): p. 6-11.
139. Joseph, S.B., et al., *Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7604-9.
140. Levin, N., et al., *Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 135-42.
141. Brooks-Wilson, A., et al., *Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 336-45.
142. Bodzioch, M., et al., *The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 347-51.
143. Rust, S., et al., *Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 352-5.
144. Vaisman, B.L., et al., *ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice*. J Clin Invest, 2001. **108**(2): p. 303-9.
145. Basso, F., et al., *Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations*. J Lipid Res, 2003. **44**(2): p. 296-302.
146. Wellington, C.L., et al., *Alterations of plasma lipids in mice via adenoviral-mediated hepatic overexpression of human ABCA1*. J Lipid Res, 2003. **44**(8): p. 1470-80.
147. Murthy, S., et al., *LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells*. J Lipid Res, 2002. **43**(7): p. 1054-64.
148. Mulligan, J.D., et al., *ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 13356-66.

149. Joyce, C.W., et al., *The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 407-12.
150. Groen, A.K., et al., *Hepatobiliary cholesterol transport is not impaired in Abca1-null mice lacking HDL*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 843-50.
151. Plosch, T., et al., *Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 33870-7.
152. Aiello, R.J., et al., *Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(4): p. 630-7.
153. Timmins, J.M., et al., *Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1333-42.
154. Klucken, J., et al., *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**(2): p. 817-22.
155. Laffitte, B.A., et al., *LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 507-12.
156. Schmitz, G., T. Langmann, and S. Heimerl, *Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism*. J Lipid Res, 2001. **42**(10): p. 1513-20.
157. Wang, N., et al., *ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9774-9.
158. Kennedy MA, B.G., Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein M, Frank J, Francone OL, Edwards A, *ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation*. Cell Metabolism, 2005. **1**: p. 121-131.
159. Ito, T., *Physiological function of ABCG1*. Drug News Perspect, 2003. **16**(8): p. 490-2.
160. Miettinen, T.A., *Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis*. Eur J Clin Invest, 1980. **10**(1): p. 27-35.
161. Salen, G., et al., *Increased sitosterol absorption, decreased removal, and expanded body pools compensate for reduced cholesterol synthesis in sitosterolemia with xanthomatosis*. J Lipid Res, 1989. **30**(9): p. 1319-30.
162. Lee, M.H., K. Lu, and S.B. Patel, *Genetic basis of sitosterolemia*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(2): p. 141-9.
163. Berge, K.E., et al., *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1771-5.
164. Yang, C., et al., *Disruption of cholesterol homeostasis by plant sterols*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 813-22.
165. Yu, L., et al., *Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol*. J Clin Invest, 2002. **110**(5): p. 671-80.

166. Yu, L., et al., *Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): p. 15565-70.
167. Graf, G.A., et al., *ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48275-82.
168. Plosch, T., et al., *Sitosterolemia in ABC-transporter G5-deficient mice is aggravated on activation of the liver-X receptor*. Gastroenterology, 2004. **126**(1): p. 290-300.
169. Yu, L., et al., *Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 8742-7.
170. Yu, L., et al., *Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16237-42.
171. Calpe-Berdiel, L., J.C. Escola-Gil, and F. Blanco-Vaca, *Are LXR-regulated genes a major molecular target of plant sterols/stanols?* Atherosclerosis, 2007.
172. Cuchel, M. and D.J. Rader, *Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis?* Circulation, 2006. **113**(21): p. 2548-55.
173. Lee, C.H. and J. Plutzky, *Liver X receptor activation and high-density lipoprotein biology: a reversal of fortune?* Circulation, 2006. **113**(1): p. 5-8.
174. Navab, M., et al., *The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL*. J Lipid Res, 2004. **45**(6): p. 993-1007.
175. Cyrus, T., et al., *Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice*. J Clin Invest, 1999. **103**(11): p. 1597-604.
176. Cyrus, T., et al., *Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice*. Circulation, 2001. **103**(18): p. 2277-82.
177. George, J., et al., *12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice*. Circulation, 2001. **104**(14): p. 1646-50.
178. Harats, D., et al., *Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(9): p. 2100-5.
179. Garner, B., et al., *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**(11): p. 6088-95.
180. Watson, A.D., et al., *Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein*. J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2882-91.
181. Mackness, M.I., et al., *Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase*. Atherosclerosis, 1993. **104**(1-2): p. 129-35.
182. Aviram, M., et al., *Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase*. J Clin Invest, 1998. **101**(8): p. 1581-90.
183. Draganov, D.I., et al., *Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation*. J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33435-42.

184. Reddy, S.T., et al., *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**(4): p. 542-7.
185. Watson, A.D., et al., *Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(2): p. 774-82.
186. Vohl, M.C., et al., *A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation*. *Biochemistry*, 1999. **38**(19): p. 5976-81.
187. Navab, M., et al., *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(9): p. 1481-94.
188. Bowry, V.W., K.K. Stanley, and R. Stocker, *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**(21): p. 10316-20.
189. Christison, J., et al., *Rapid reduction and removal of HDL- but not LDL-associated cholesteryl ester hydroperoxides by rat liver perfused in situ*. *Biochem J*, 1996. **314 (Pt 3)**: p. 739-42.
190. Sattler, W. and R. Stocker, *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)**: p. 771-8.
191. Hayek, T., et al., *HDL apolipoprotein A-I attenuates oxidative modification of low density lipoprotein: studies in transgenic mice*. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995. **33**(10): p. 721-5.
192. Konig, V., et al., *The significance of high-density lipoproteins (HDL) in the clearance of intravenously administered bacterial lipopolysaccharides (LPS) in mice*. *Hepatology*, 1988. **35**(3): p. 111-5.
193. Wu, A., C.J. Hinds, and C. Thiemermann, *High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications*. *Shock*, 2004. **21**(3): p. 210-21.
194. Navab, M., et al., *D-4F and Statins Synergize to Render HDL Anti-inflammatory in Mice and Monkeys and Cause Lesion Regression in Old Apolipoprotein E Null Mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005.
195. Gupta, H., et al., *Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by an apolipoprotein AI mimetic peptide*. *Circ Res*, 2005. **97**(3): p. 236-43.
196. Cabana, V.G., et al., *Serum paraoxonase: effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(4): p. 780-92.
197. De Geest, B., et al., *Effect of overexpression of human apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 apo E-deficient mice on 2 lipoprotein-associated enzymes, platelet-activating factor acetylhydrolase and paraoxonase. Comparison of adenovirus-mediated human apo A-I gene transfer and human apo A-I transgenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(10): p. E68-75.
198. Sorenson, R.C., et al., *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**(9): p. 2214-25.

199. Dansky, H.M., et al., *Apo A-I inhibits foam cell formation in Apo E-deficient mice after monocyte adherence to endothelium*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 31-9.
200. Norata, G.D., et al., *High-density lipoproteins induce transforming growth factor-beta2 expression in endothelial cells*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2805-11.
201. Castellani, L.W., et al., *Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles*. J Clin Invest, 1997. **100**(2): p. 464-74.
202. Ribas, V., et al., *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**(8): p. 789-97.
203. Bergmeier, C., R. Siekmeier, and W. Gross, *Distribution Spectrum of Paraoxonase Activity in HDL Fractions*. Clin Chem, 2004. **50**(12): p. 2309-15.
204. Gaidukov, L. and D.S. Tawfik, *High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with ApoA-I*. Biochemistry, 2005. **44**(35): p. 11843-54.
205. Holvoet, P., et al., *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**(12): p. 1977-83.
206. Boisfer, E., et al., *Antioxidant properties of HDL in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II*. J Lipid Res, 2002. **43**(5): p. 732-41.
207. Shih, D.M., et al., *Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model*. J Clin Invest, 1996. **97**(7): p. 1630-9.
208. Kuo, C.L. and B.N. La Du, *Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity*. Drug Metab Dispos, 1998. **26**(7): p. 653-60.
209. Mackness, M.I., P.N. Durrington, and B. Mackness, *How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation*. Curr Opin Lipidol, 2000. **11**(4): p. 383-8.
210. Ferretti, G., et al., *Structural modifications of HDL and functional consequences*. Atherosclerosis, 2006. **184**(1): p. 1-7.
211. Getz, G.S. and C.A. Reardon, *Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues*. Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(3): p. 261-7.
212. Ng, C.J., et al., *The paraoxonase gene family and atherosclerosis*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(2): p. 153-63.
213. Shih, D.M., et al., *Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6690): p. 284-7.
214. Shih, D.M., et al., *Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17527-35.
215. Rozenberg, O., et al., *Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(6): p. 774-84.

216. Oda, M.N., et al., *Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(3): p. 921-7.
217. Tward, A., et al., *Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice*. Circulation, 2002. **106**(4): p. 484-90.
218. Rozenberg, O., D.M. Shih, and M. Aviram, *Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice*. Atherosclerosis, 2005. **181**(1): p. 9-18.
219. Stremler, K.E., et al., *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11095-103.
220. Theilmeyer, G., et al., *HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice*. Faseb J, 2000. **14**(13): p. 2032-9.
221. Noto, H., et al., *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase binds to all the murine lipoproteins, conferring protection against oxidative stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(5): p. 829-35.
222. Hase, M., et al., *Reduction in the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice induced by electroporation-mediated transfer of the human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene into skeletal muscle*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **70**(1-2): p. 107-18.
223. Forte, T.M., et al., *Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice*. J Lipid Res, 2002. **43**(3): p. 477-85.
224. Chen, C.H., *Platelet-activating factor acetylhydrolase: is it good or bad for you?* Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(3): p. 337-41.
225. Zalewski, A. and C. Macphee, *Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(5): p. 923-31.
226. Tsimihodimos, V., et al., *Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(2): p. 306-11.
227. Tsimihodimos, V., et al., *Fenofibrate induces HDL-associated PAF-AH but attenuates enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins*. J Lipid Res, 2003. **44**(5): p. 927-34.
228. Noto, H., et al., *Modulation of HDL metabolism by probucol in complete cholesteryl ester transfer protein deficiency*. Atherosclerosis, 2003. **171**(1): p. 131-6.
229. Bisoendial, R.J., et al., *Consequences of cholesteryl ester transfer protein inhibition in patients with familial hypoalphalipoproteinemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(9): p. e133-4.
230. Zhang, B., et al., *Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by JTT-705 increases apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein and favorably affects the function and enzyme composition of high-density lipoprotein in rabbits*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(10): p. 1910-5.
231. Huang, Z., et al., *Cholesteryl ester transfer protein inhibitor (JTT-705) and the development of atherosclerosis in rabbits with severe hypercholesterolaemia*. Clin Sci (Lond), 2002. **103**(6): p. 587-94.
232. Marzal-Casacuberta, A., et al., *Functional lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and high density lipoprotein deficiency in transgenic mice*

- overexpressing human apolipoprotein A-II*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6720-8.
233. Julve, J., et al., *Mechanisms of HDL deficiency in mice overexpressing human apoA-II*. J Lipid Res, 2002. **43**(10): p. 1734-42.
234. Dietschy, J.M. and S.D. Turley, *Control of cholesterol turnover in the mouse*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 3801-4.
235. Connelly, M.A., et al., *SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis*. J Lipid Res, 2003. **44**(2): p. 331-41.
236. Camarota, L.M., et al., *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**(26): p. 27599-606.
237. Li, L. and H.J. Pownall, *Effects of high-density lipoprotein(2) on cholesterol transport and acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase activity in P388D1 macrophages*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1530**(1): p. 111-22.
238. Brundert, M., et al., *Scavenger Receptor Class B Type I Mediates the Selective Uptake of High-Density Lipoprotein-Associated Cholesteryl Ester by the Liver in Mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**: p. 1-6.
239. Brundert, M., et al., *Hepatic lipase mediates an increase in selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters by cells in culture independent from SR-BI*. J Lipid Res, 2003. **44**(5): p. 1020-32.
240. Vassiliou, G. and R. McPherson, *A novel efflux-recapture process underlies the mechanism of high-density lipoprotein cholesteryl ester-selective uptake mediated by the low-density lipoprotein receptor-related protein*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(9): p. 1669-75.
241. Morrison, J.R., M.J. Silvestre, and R.C. Pittman, *Cholesteryl ester transfer between high density lipoprotein and phospholipid bilayers*. J Biol Chem, 1994. **269**(19): p. 13911-8.
242. Nishida, H.I. and T. Nishida, *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**(11): p. 6959-64.
243. Uelmen, P.J., et al., *Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro*. J Biol Chem, 1995. **270**(44): p. 26192-201.
244. McNeish, J., et al., *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**(8): p. 4245-50.
245. Aiello, R.J., D. Brees, and O.L. Francone, *ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(6): p. 972-80.
246. Wang, M.D., V. Franklin, and Y.L. Marcel, *In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1837-42.
247. Ohama, T., et al., *Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(3): p. 625-30.

248. Brousseau, M., *ATP-binding cassette transporter A1, fatty acids, and cholesterol absorption*. Current Opinion in Lipidology, 2003. **14**: p. 35-40.
249. Joyce, C., et al., *Study of ABCA1 function in transgenic mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(6): p. 965-71.
250. van Eck, M., et al., *Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6298-303.
251. Francone, O.L., et al., *Increased cholesterol deposition, expression of scavenger receptors, and response to chemotactic factors in Abca1-deficient macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1198-205.
252. Pape, M.E., et al., *Apo B metabolism in the cynomolgus monkey: evidence for post-transcriptional regulation*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1086**(3): p. 326-34.
253. Serrat-Serrat, J., et al., *Marathon runners presented lower serum cholesteryl ester transfer activity than sedentary subjects*. Atherosclerosis, 1993. **101**(1): p. 43-9.
254. Cazita, P.M., et al., *Cholesteryl ester transfer protein expression attenuates atherosclerosis in ovariectomized mice*. J Lipid Res, 2003. **44**(1): p. 33-40.
255. Chiang, J.Y., *Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms*. J Hepatol, 2004. **40**(3): p. 539-51.
256. Luo, Y. and A.R. Tall, *Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element*. J Clin Invest, 2000. **105**(4): p. 513-20.
257. Masson, D., et al., *Cholesteryl ester transfer protein modulates the effect of liver X receptor agonists on cholesterol transport and excretion in the mouse*. J Lipid Res, 2004. **45**(3): p. 543-50.
258. Westerterp, M., et al., *Cholesteryl ester transfer protein decreases high-density lipoprotein and severely aggravates atherosclerosis in APOE*3-Leiden mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(11): p. 2552-9.
259. Klerkx, A.H., et al., *Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(4): p. 706-15.
260. Gauthier, A., et al., *Cholesteryl ester transfer protein directly mediates selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by the liver*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(10): p. 2177-84.
261. Tanigawa, H., et al., *Expression of cholesteryl ester transfer protein in mice promotes macrophage reverse cholesterol transport*. Circulation, 2007. **116**(11): p. 1267-73.
262. Chiba, H., et al., *[Complete cholesteryl ester transfer protein deficiency increases oxidized-LDL in plasma]*. Rinsho Byori, 1997. **45**(1): p. 55-7.
263. Ma, K., et al., *Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2748-53.
264. Plosch, T., et al., *Abcg5/Abcg8-independent pathways contribute to hepatobiliary cholesterol secretion in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(3): p. G414-23.

Bibliografia

265. Yu, L., et al., *Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice*. J Lipid Res, 2004. **45**(2): p. 301-7.
266. Jiang, X.C., et al., *Enlargement of high density lipoprotein in mice via liver X receptor activation requires apolipoprotein E and is abolished by cholesteryl ester transfer protein expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 49072-8.
267. Wilund, K.R., et al., *High-level expression of ABCG5 and ABCG8 attenuates diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice*. J Lipid Res, 2004. **45**(8): p. 1429-36.
268. Basso, F., et al., *Hepatic ABCG5/G8 overexpression reduces apoB-lipoproteins and atherosclerosis when cholesterol absorption is inhibited*. J Lipid Res, 2007. **48**(1): p. 114-26.

