



Paper de la proteïna scavenger AIM en l'activació de macròfags i desenvolupament de cèl·lules escumoses

Núria Amézaga Solé

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de Doctorat en Biomedicina

**Paper de la proteïna scavenger AIM en
l'activació de macròfags i
desenvolupament de cèl·lules escumoses**

Doctorand

Núria Amézaga Solé

Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

Director de la tesi

Dra. Maria Rosa Sarrias Fornés

Tutor de la tesi

Dr. Jorge Lloberas Cavero

Fundació Institut d'Investigació
en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

Universitat de Barcelona
Departament Fisiologia i Immunologia

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	5
1. MALALTIES CARDIOVASCULARS. L'ATEROSCLEROSI.....	5
1.1. Factors de risc en les MCV	7
1.2. Diagnòstic clínic i possibles biomarcadors de les MCV.....	7
1.3. Tractament farmacològic de les MCV, les Estatines.....	11
2. MECANISMES MOLECULARS DE L'ATEROSCLEROSI.....	12
2.1. Implicació del colesterol i les lipoproteïnes en l'aterosclerosi.....	14
2.1.1. Modificació de les lipoproteïnes.....	16
2.1.2. Components biològics en l'OxLDL i activitat biològica.....	17
2.2. Tipus cel·lulars implicats en la lesió ateroscleròtica.....	18
2.2.1. Implicació del monòcit/macròfag en l'aterosclerosi.....	22
2.3. Els Receptors Scavenger, principals mediadors de la captació de mLDL.....	26
2.4. Regulació de l'eflux de colesterol: Els receptors nuclears.....	32
2.4.1. Acció antiinflamatòria i antiapoptòtica dels receptors nuclears.....	35
3. La proteïna Apoptosis Inhibitor of Macrophages.....	37
4. MODELS MURINS D'ATEROSCLEROSI.....	42
5. MODELS CEL·LULARS HUMANS D'ATEROSCLEROSI.....	44
MATERIAL I MÈTODES	45
6. Cultius de macròfags.....	45
6.1. Macròfags humans derivats de monòcits de sang perifèrica.....	45
6.2. Generació de la línia cel·lular THP1-hAIM.....	46
7. SDS i Western blot.....	48
8. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant PCR a temps real.....	48
9. Aïllament de HDL, LDL i modificació de LDL.....	49
9.1. Modificació de LDL per Oxidació (OxLDL).....	50
9.2. Modificació de LDL per Acetilació (AcLDL).....	50
10. Determinació dels nivells d'AIM en sèrum.....	52
10.1. Models murins Ateroscleròtics apoE ^{-/-} i LDLr ^{-/-}	52
10.2. Pacients amb Arteriopatia Perifèrica (PAD).....	53
11. Anàlisi <i>in vitro</i> de l'expressió de hAIM en macròfags escumosos.....	55

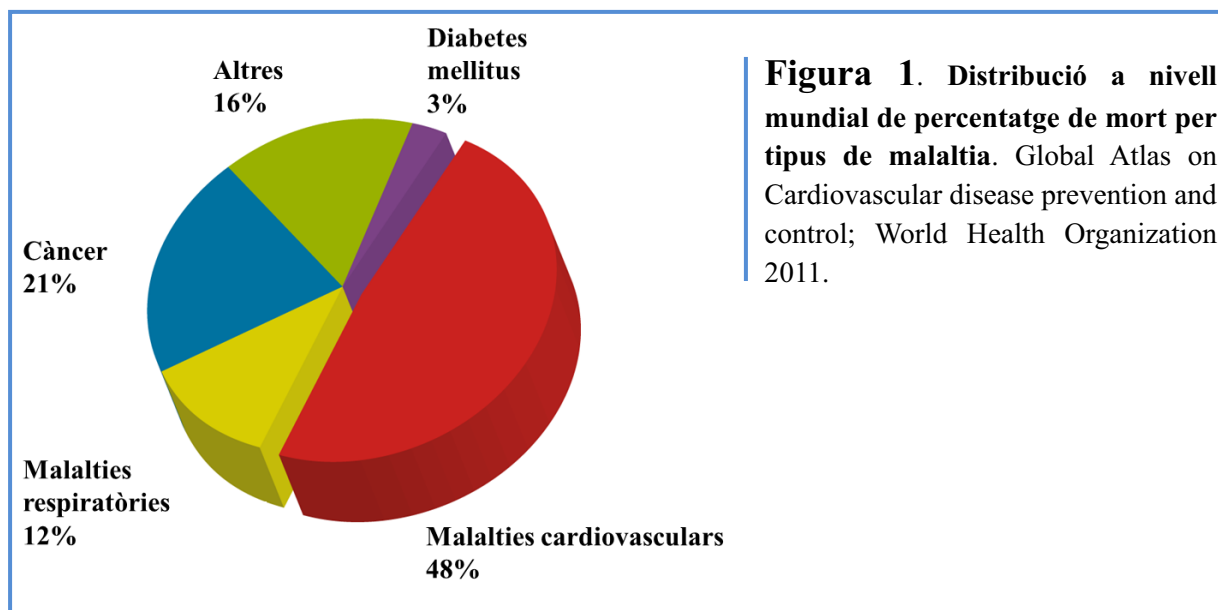
12. Assaig d'apoptosi cel·lular.....	55
13. Quantificació de la formació de macròfags escumosos.....	56
14. Quantificació de colesterol total i èsters de colesterol.....	57
15. Assaig d'eflux de colesterol.....	58
16. Captació de DiI-OxLDL i DiI-AcLDL.....	58
17. Tractament de les cèl·lules THP1 per l'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant PCR quantitativa.....	59
18. Unió de hAIM a OxLDL o AcLDL.....	59
19. Assaig de captació de DiI-OxLDL a través de CD36 en cèl·lules HEK-293.....	60
20. Anàlisi de l'expressió de CD36, CD11a i CD18 per citometria de flux.....	61
21. Assaig d'adhesió de les cèl·lules THP1 a l'ectodomini d'ICAM-1.....	61
OBJECTIUS	63
RESULTATS i DISCUSSIÓ	64
Treball 1:	64
Anàlisi de l'expressió d'AIM durant la patologia de l'aterosclerosi.....	64
Discussió.....	70
Treball 2:	72
Anàlisi de la participació de hAIM en els mecanismes moleculars del macròfag implicats en l'aterosclerosi.....	72
Discussió.....	84
DISCUSSIÓ GENERAL	87
CONCLUSIONS	89
REFERÈNCIES	91

INTRODUCCIÓ

1. MALALTIES CARDIOVASCULARS. L'ATEROSCLEROSI.

Les malalties cardiovasculars (MCV) es refereixen a les malalties del cor i del sistema de vasos sanguinis (artèries, capil·lars, venes) de tot l'organisme. Durant el segle XX ha tingut lloc una important evolució en la patogènesi de les MCV, ja que aquestes van començar a sorgir després de que la població aconseguís evitar la mortalitat degut a malalties infeccioses i quan moltes societats van adoptar hàbits alimentaris que causaven aquestes malalties.

Actualment, segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS) les MCV constitueixen la primera causa de mort als països desenvolupats, representant un 48 % de la mortalitat total mundial [1].

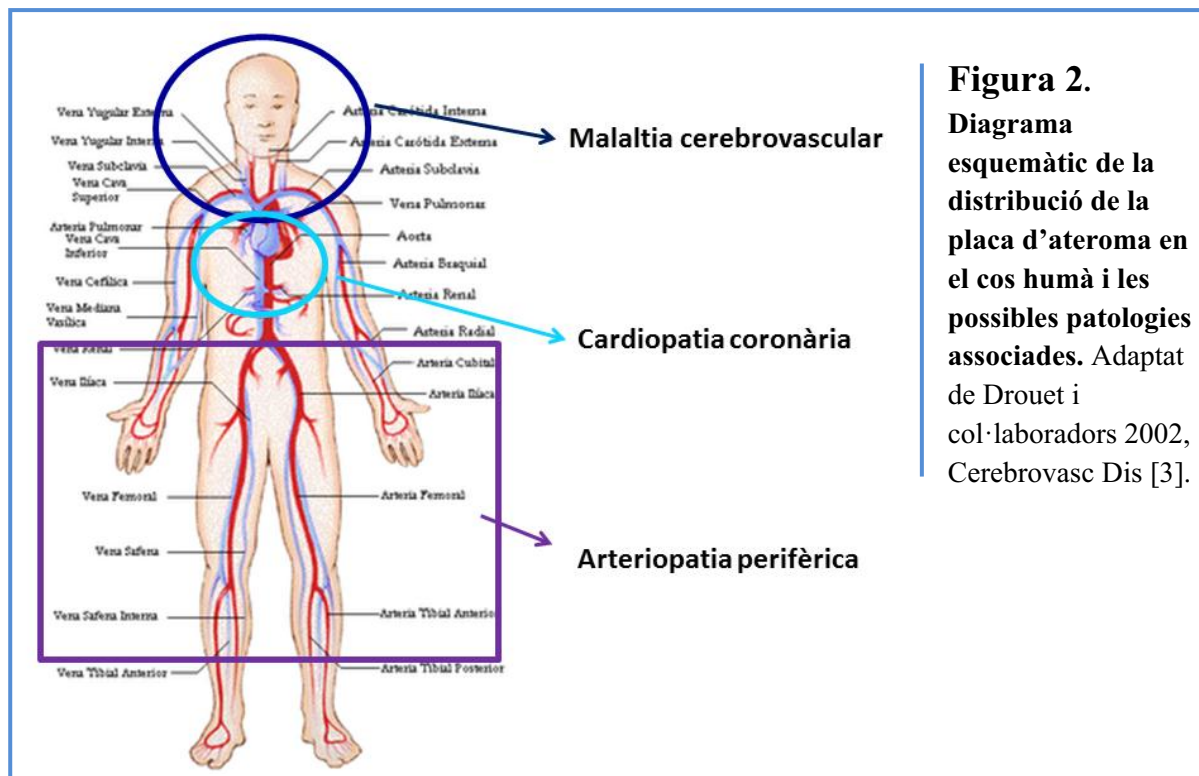


A Espanya, segons la Societat Espanyola de Cardiologia (SEC) l'impacte sanitari i social de les MCV no para d'augmentar i seguirà fent-ho en les pròximes dècades. Concretament la SEC destaca que les MCV han estat les responsables del 31.2% de defuncions a Espanya durant el 2010, suposant un total de 119.063 defuncions. En global, s'ha estimat que entre el 1990 i el 2020, les MCV augmentaran un 29% en l'home i un 48% en la dona en els països desenvolupats i un 120% en les dones, 127% en homes en països en

vies de desenvolupament [2]. Un gran nombre de MCV tenen el seu origen en l'aterosclerosi com per exemple l'angina de pit i l'infart de miocardi [3]. L'aterosclerosi és una lesió de l'artèria caracteritzada per un engruiximent i pèrdua d'elasticitat en la paret íntima, degut a l'emmagatzematge de colesterol. A mesura que s'acumula el colesterol en l'artèria, aquesta es va ocloïen gradualment fins a obstruir-se, sense deixar passar sang, formant el que s'anomena **placa d'ateroma**. L'oclusió dels vas sanguini (anomenat trombosi) impedeix la irrigació al teixit, compromentent així la funcionalitat circulatoria.

Les plaques d'ateroma tenen una distribució característica, ja que es presenten fonamentalment en les artèries de gran i mitjà calibre, i segons les zones que irriguen les artèries afectades podem diferenciar tres tipus generals de MCV d'origen ateroscleròtic (**Figura 2**) [3].

- **Malaltia cerebrovascular:** patologia que afecta els vasos sanguinis que irriguen el cervell (artèria caròtide).
- **Cardiopatia coronària:** patologia dels vasos sanguinis que irriguen el múscul cardíac (artèries coronàries).
- **Arteriopatia perifèrica:** quan el dany es produeix en vasos sanguinis allunyats del cor com ara els que irriguen els membres superiors i inferior (aorta, artèries ilíacques i artèries femorals). Aquesta patologia també rep el nom de Malaltia Arterial Perifèrica (PAD) [4].



L'aterosclerosi mostra una heterogeneïtat en el temps, essent una malaltia amb manifestacions agudes i cròniques. Poques malalties humanes tenen un període “d’incubació” més prolongat que l'aterosclerosi, l'evolució de la lesió té lloc lentament durant dècades i moltes vegades la patologia progressa de forma asimptomàtica. Les artèries es comencen a afectar en la segona o tercera dècada de vida [5, 6]. Degut a aquest llarg període d'inactivitat clínica, les complicacions importants de la placa d'ateroma habitualment apareixen de forma sobtada. És per això que en la pràctica clínica el coneixement dels factors de risc i un adequat diagnòstic clínic afavoreixen en la prevenció de les MCV.

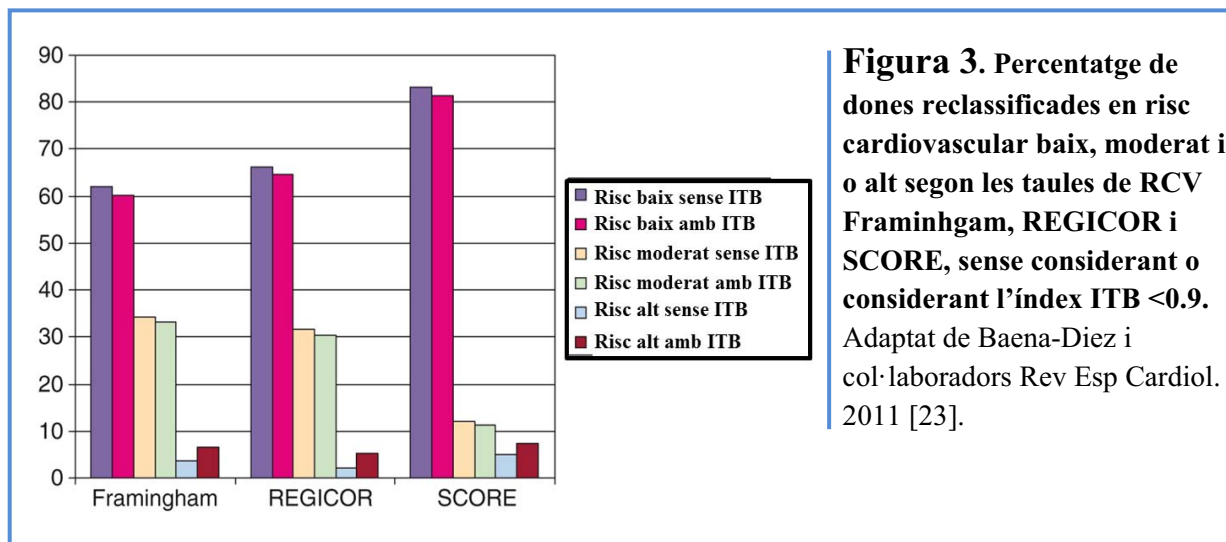
1.1. Factors de risc en les MCV

L'aterosclerosi és una malaltia complexa en la que s'han associat multitud de factors de risc. El paper de l'alimentació esdevé fonamental en la prevenció d'aquest tipus de malalties, tant per mitjà de la promoció d'una dieta equilibrada i saludable entre la població general, com a través del tractament dels factors de risc associats. Els factors de risc de les MCV es poden classificar en dues categories; factors amb component genètic: com antecedents familiars [7], hipertensió arterial (HTA) [8], diabetis i obesitat [9], síndrome metabòlica [10] o bé factors ambientals: dieta rica en grasses saturades i colesterol [11], sedentarisme [9], tabaquisme [12] o bé agents infecciosos [13, 14]. Entre tots els factors de risc identificats per estudis epidemiològics els valors elevats de colesterol en sèrum són probablement els més predictius en el desenvolupament de l'aterosclerosi en humans i en models animals experimentals, inclòs en l'absència d'altres factors de risc [15].

1.2. Diagnòstic clínic i possibles biomarcadors de les MCV.

L'aterosclerosi és una malaltia multifactorial i per tant el seu diagnòstic no es centra en un sol únic test. El diagnòstic de la patologia requereix de la combinació de tècniques d'imatge d'artèries i venes, per detectar l'obstrucció o oclusió del vas com són l'Eco-cardiograma, Rajos X toràcics, Angiograma... En el cas concret de la PAD, cal destacar la utilització d'un índex de diagnòstic, anomenat Índex turmell-braç (ITB) o bé ABI del anglès “Ankle-Brachial Index”. Aquest índex prediu de forma no invasiva el nivell d'afectació de patir un event ateroescleròtic. Per determinar l'índex ITB, es divideix la pressió sanguínia sistòlica del turmell per la pressió sanguínia sistòlica del braç [16].

Degut a que l'aterosclerosi és una malaltia silenciosa, s'han desenvolupat fórmules de predicció del risc coronari i/o cardiovascular (RCV) com a eines útils per identificar pacients d'alt risc cardiovascular. En aquest sentit existeixen taules d'estimació del RCV, que consisteixen en càlculs basats en diversos paràmetres, on l'edat del pacient és un dels factors que més condiciona el resultat final de risc (a major edat, major risc). També hi tenen en compte altres factors, com el gènere, la pressió arterial, els nivells de colesterol, el consum o no de tabac i el fet de patir o no diabetis. Aquestes taules són anomenades Framingham [17], SCORE [18] o REGICOR [19]. La taula que es va utilitzar inicialment és la **taula de Framingham** [17, 20], basada en un estudi fet als Estats Units, on es va fer un seguiment al llarg de 40 anys d'aproximadament 100.000 persones, es van observar els problemes coronaris que van patir en aquest període i la seva relació amb els factors de risc cardiovascular. A Espanya s'utilitzen bàsicament l'**Score** [18] i el **Regicor** [19]. L'**Score** és una taula europea amb un model per a països d'alt risc, fonamentalment nòrdics, i un altre model per a països de baix risc, entre el quals s'inclou Espanya. Aquesta taula calcula la probabilitat de mort d'origen cardiovascular en els pròxims 10 anys i es pot aplicar a persones fins als 65 anys. El **Regicor** és una taula que adapta les condicions de l'estudi de Framingham a la població mediterrània. Es va fer a Girona després d'un seguiment de totes les persones que van patir un infart o una angina de pit al llarg de 25 anys. El Regicor calcula la probabilitat de patir alguna d'aquestes dues patologies en 10 anys i es pot aplicar a persones que tinguin fins a 74 anys [19]. Així doncs aquestes taules són capaces d'identificar els pacients d'alt risc cardiovasculars, prioritaris a l'hora d'intervenir amb fàrmacs. Però, degut a l'escassa capacitat de discriminació dels factors utilitzats en les taules, la majoria d'esdeveniments cardiovasculars es produeixen en individus amb un risc cardiovascular moderat. Recentment gràcies a l'estudi de la prevalència de l'aterosclerosi en la població, dut a terme per l'estudi multicèntric ARTPER que inclou 28 centres d'atenció primària del Barcelonès Nord-Maresme i Barcelona Ciutat, s'observa que el càlcul de l'índex ITB millora la classificació del risc cardiovascular de la població i es proposa afegir l'ITB a les taules de risc cardiovascular [21-23]. Segons l'estudi ARTPER un 81% dels pacients amb Arteriopatia perifèrica no estaven diagnosticats prèviament. Com s'observa en la **Figura 3** mitjançant el càlcul de l'índex ITB es reclassifica a una important proporció d'individus, prèviament classificats mitjançant les taules de RCV (sobretot en les taules Framingham i REGICOR) cap a la categoria de risc alt [23].



Per altra banda un dels majors reptes en la medicina cardiovascular és trobar la manera de predir el risc a patir un efecte trombòtic agut. És per això que en les últimes dècades hi ha hagut un gran interès en la recerca de biomarcadors sanguinis de diagnòstic i pronòstic de la patologia. La paret vascular allibera al corrent sanguini molècules que poden reflectir els processos patològics que tenen lloc en ella, i per altra part la sang té una participació evident en la formació del trombes. La definició del terme biomarcador va ser normalitzada recentment (2010) per la *National Institut of Health* com “ una característica objectivament mesurable com indicadora de processos biològics normals, patològics, o de resposta farmacològica a una intervenció terapèutica” [24]. Des del punt de vista bioquímic són molècules sistèmiques que es poden determinar en el laboratori, proteïnes, enzims i/o productes metabòlics que representen directa o indirectament un o més processos biològics o patològics actius d’un sistema definit o en estat de patologia. En la **Taula 1** es resumeix alguns del principals biomarcadors relacionats amb l’aterosclerosi.

<i>Biomarcador</i>	<i>Paper Fisiopatològic</i>	<i>Fase Aterosclerosi</i>
CRP	Trombosi, captació LDL, disfunció endotelial	Trombosi, Lesió precoç, Placa vulnerable
MPO	Captació LDL, activació MMP, ruptura placa d'ateroma	Lesió precoç, Placa vulnerable
MCP-1	Reclutament leucòcits	Lesió precoç
sCD40L	Trombosi, expressió MMP, disfunció endotelial	Trombosi
MMP 1,2 i 9	Ruptura placa d'ateroma	Placa vulnerable
Lp-PLA2	Oxidació LDL, inflamació	Lesió precoç, Placa vulnerable
sICAM-1	Reclutament leucòcits	Lesió precoç
sVCAM-1	Reclutament leucòcits	Lesió precoç
vWF	Disfunció endotelial	Trombosi
P-selectina	Agregació de plaquetes, reclutament de leucòcits	Trombosi
SAA	Formació macròfag escumós	Placa vulnerable
Fibrinogen	Coagulació, agregació de plaquetes	Trombosi
PAPP-A	Proliferació de SMC, ruptura placa d'ateroma	?
IL-6	Inflamació, ruptura placa d'ateroma	Lesió precoç
IL-10	Antiinflamació	Lesió precoç
TNFα	Inflamació	Lesió precoç
Homocisteïna	Disfunció endotelial, trombosi	Trombosi

Taula 1. Principals biomarcadors d'aterosclerosi. Abreviacions: CRP, proteïna C reactiva; MPO, mieloperoxidasa; MCP-1, proteïna-1 quimioattractant de monòcits, Lp-PLA2, lipoproteïna associada a fosfolipasa A2; sICAM-1, molècula 1 adhesió intercel·lular soluble; sVCAM-1, molècula 1 vascular soluble; vWF, factor Von Willebrand; SAA, sèrum Amiloide A; PAPP-A, Proteïna plasmàtica associada a embaràs; SMC, cèl·lules múscul llis. Adaptat de Ferri i col·laboradors Curr Opin Lipidol, 2006 [25].

Entre aquests biomarcadors la proteïna C reactiva (CRP, de l'anglès C-reactive protein) és la més coneguda. Diversos estudis han observat que els nivells de CRP en sang prediuen amb exactitud el risc de partir un infart miocardiàc, un procés cerebrovascular o bé PAD [26-28]. La CRP és una proteïna plasmàtica circulat, sintetitzada per les cèl·lules endotelials lesionades, que augmenta els seus nivells en resposta a la inflamació (proteïna de fase aguda). Però fins el moment no existeix un biomarcador acceptat en la pràctica clínica. El coneixement de les molècules que participen en els diferents processos patològics en l'aterosclerosi pot servir per desenvolupar nous biomarcadors de la patologia. La identificació de nous biomarcadors, juntament amb les tècniques d'imatge, poden ajudar a millorar la predicció d'events dels processos vasculars aguts.

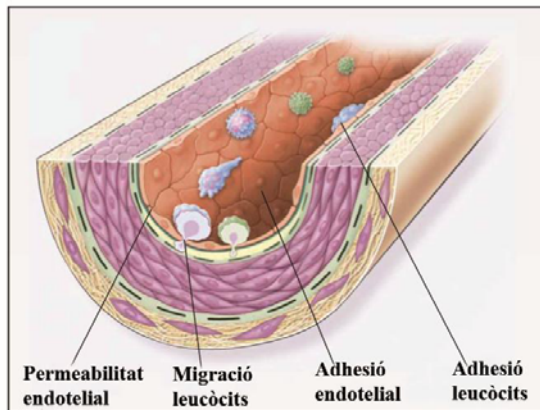
1.3. Tractament farmacològic de les MCV, les Estatines.

Mitjançant el coneixement dels mecanismes moleculars que controlen la biosíntesi del colesterol es van desenvolupar les Estatines, fàrmac que redueix significativament la mortalitat cardiovascular en pacients amb nivells elevats de colesterol en sang o hipercolesterolèmics [29, 30]. Tot i no ser l'única opció de tractament, les Estatines representen el conjunt de medicaments més efectius en el tractament de la hipercolesterolèmia; aquestes inhibeixen l'enzim HMG CoA reductasa, el qual intervé en la síntesi del colesterol en les cèl·lules [31] i d'aquesta manera es redueix la concentració de colesterol en la sang. Tot i això el subministrament d'Estatines no és suficient per prevenir completament la progressió de l'aterosclerosi en molts individus [32]. Es requereix el coneixement d'altres factors implicats en l'aterosclerosi per desenvolupar noves estratègies per prevenir i tractar la malaltia.

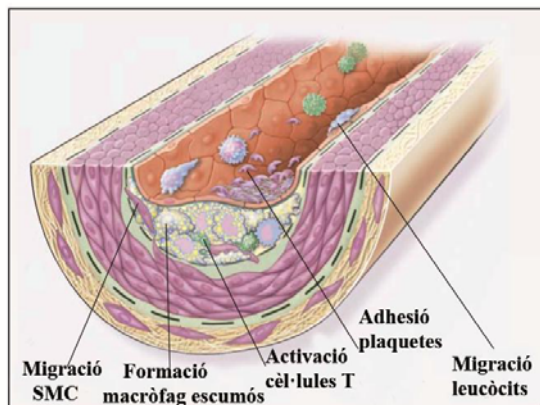
2. MECANISMES MOLECULARS DE L'ATEROSCLEROSI.

L'aterosclerosi es pot considerar una patologia resultat d'un desordre en el metabolisme lipídic i d'una inflamació crònica. A nivell fisiològic consisteix en una complexa interacció entre la **paret arterial** i les **cèl·lules del sistema immunitari**, degut a una acumulació de materials grassos com el **colesterol** transportat en la sang per lipoproteïnes (LDL). El resultat d'aquesta acumulació condueix a la modificació de les LDL, les quals són capaces de ser endocitades de forma incontrolada per macròfags i cèl·lules del múscul llis (SMC) presents en l'artèria, creant les cèl·lules escumoses, en resposta a aquest ambient es crea un cercle inflamatori creixent responsable de l'acumulació de més cèl·lules i de més colesterol en l'artèria. En aquest context es produeix la fibrosi de la capa íntima de la paret arterial, anomenada **placa d'ateroma**. Durant l'evolució de la placa d'ateroma, l'artèria es va taponant gradualment fins a obstruir-se, impeding el subministrament de nutrients i oxigen als diferents teixits, provocant l'infart de miocardi, l'angina o fins i tot la mort [14].

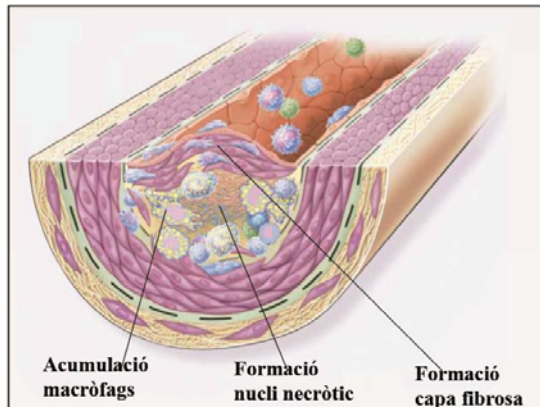
La formació de la placa d'ateroma i la seva posterior evolució es desenvolupa en 4 estadis diferents: formació de la **lesió precoç**, **estria de greix**, **lesió avançada** i **ruptura de la placa**. En els següents capítols de la tesi es desenvoluparan els factors moleculars més rellevants implicats en la formació de la placa d'ateroma. Els principals esdeveniments en cada un d'aquests estadis es detallen en la **Figura 4**.



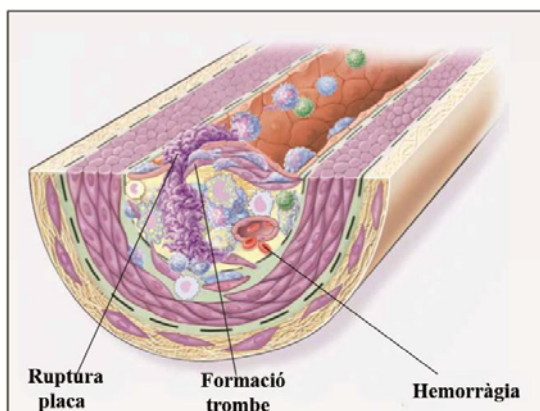
1. Lesió Precoç: Alteració de l'endoteli arterial, augmenta la permeabilitat al colesterol transportat per les lipoproteïnes (LDL) presents en la sang i altres factors plasmàtics. Increment en l'expressió de molècules d'adhesió que afavoreix la unió de leucòcits i la seva migració a l'íntima arterial. Acumulació de lípids i macròfags en l'íntima arterial. Canvis microscòpics sense lesió en el teixit.



2. Estria de greix: Retenció i modificació de les LDL creant les LDL modificades (mLDL) en l'espai subendotelial. Formació i acumulació de cèl·lules escumoses derivades de la captació de mLDL pels macròfags i cèl·lules del múscul llis (SMC). Augmenta l'acumulació de més lípids extracel·lulars. S'inicia la migració de les SMC i l'adhesió plaquetària.



3. Lesió Avançada: Continua l'acumulació de cèl·lules escumoses, algunes d'aquestes cèl·lules escumoses moren per apoptosi i es va formant un nucli lipídic necròtic. Augmenta la proliferació i migració de les SMC que a la vegada incrementen la secreció de matriu extracel·lular, augmentant el reclutament de leucòcits. Aquestes plaques acostumen a ser asimptomàtiques.

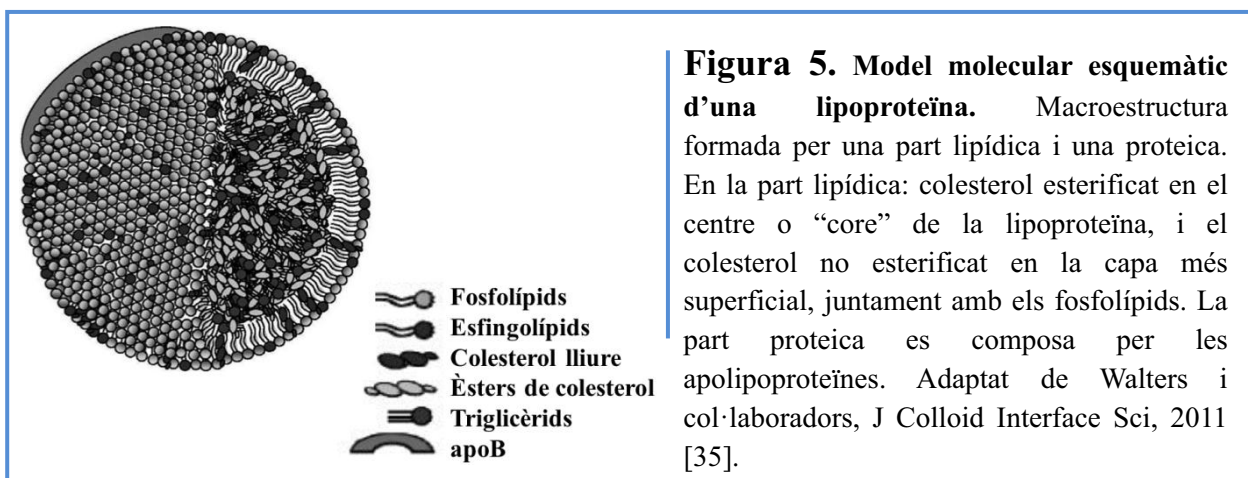


4. Ruptura de la placa: L'activitat de determinats enzims com les metal·loproteïnes, secretades pels macròfags activats, contribueixen a la ruptura de la coberta fibrosa i a la formació del trombe. S'obstrueix parcial o completament la llum del vas, és en aquest estat on es dona lloc a manifestacions clíniques agudes.

Figura 4. Esquema dels quatre estadis principals en l'evolució de la placa d'ateroma. Adaptat de Ross i col·laboradors N Engl J Med, 1999 [14].

2.1. Implicació del colesterol i les lipoproteïnes en l'aterosclerosi.

El procés aterogènic es caracteritza per l'acumulació i retenció del colesterol en l'endoteli arterial [33]. El colesterol és un component essencial de tots els teixits, doncs forma part de les membranes cel·lulars i és precursor de molècules com les vitamines, hormones i sals biliars. L'origen del colesterol en l'organisme consta de dues fonts diferents, l'externa que prové de la dieta i l'interna, colesterol que produeix el propi organisme, essent el fetge el principal òrgan productor [34]. Quan el colesterol no interacciona amb cap molècula s'anomena colesterol lliure (FC, de l'anglès Free Cholesterol) però quan aquest viatja en la sang, degut a les propietats hidrofòbiques del seu grup alcohol (-OH), aquest s'uneix al grup àcid (-COOH) de les proteïnes formant els èsters de colesterol (CE), procés anomenat esterificació del colesterol. D'aquesta manera el colesterol es transporta en la sang unit a proteïna i la macroestructura formada pel complex lipídic i proteïna s'anomena **lipoproteïna** [35]. Les lipoproteïnes són estructures que es componen d'un nucli lipídic altament hidrofòbic, on trobem els èsters de colesterol i els triglicèrids, envoltat d'una coberta amfipàtica constituïda pel colesterol lliure, els fosfolípids i cadenes polipeptídiques anomenades apolipoproteïnes (**Figura 5**). S'han descrit 8 tipus d'apolipoproteïnes involucrades en la formació de l'estructura de les lipoproteïnes, anomenades apoA-1, apoA-2, apoB-48, apoC-3, etc. Les apolipoproteïnes són elements claus en el metabolisme dels lípids ja que a part de tenir una funció estructural en les lipoproteïnes, són els llocs específics de reconeixement i d'unió pels seus receptors corresponents.



Les lipoproteïnes es poden classificar segons la seva grandària, la seva densitat o bé segons la seva composició apolipoproteica. Tradicionalment les lipoproteïnes s'han classificat d'acord amb la densitat, reflex de la relació lípid/proteïna en les següents famílies (de menor a major densitat): quilomicrons, lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), lipoproteïnes de densitat intermitja (IDL), lipoproteïnes de baixa densitat (**LDL**) i lipoproteïnes d'alta densitat (**HDL**). Aquestes últimes es coneixen com les lipoproteïnes protectores i es poden subdividir en dos grups: HDL2 de major grandària i riques en lípids; HDL3 de major densitat pel seu elevat contingut proteic. L'LDL és la principal lipoproteïna transportadora de colesterol en sang, responsable d'aportar el colesterol necessari a la cèl·lula. Però en condicions patològiques, els nivells plasmàtics de LDL s'incrementen i poden desencadenar el procés ateroescleròtic. Els nivells plasmàtics de LDL són regulats mitjançant el seu receptor en la cèl·lula, el receptor LDL.

El **receptor de LDL** (LDLr) és una glicoproteïna transmembrana de la superfície cel·lular, constituïda per 839 aminoàcids i expressada en totes les cèl·lules nucleades. El LDLr reconeix les apolipoproteïnes majoritàries de les LDL (apoB-100 i apoE), mitjançant la internalització cel·lular de les LDL plasmàtiques. Les vesícules que són endocitades es fusionen i es converteixen en endosomes, en l'interior de les quals les LDL es dissocien del receptor, el qual és reciclat altre cop cap a la membrana, mentre que els èsters de colesterol transportats per les LDL són degradats a colesterol no esterificat o colesterol lliure en el compartiment lisosòmic, i aquest colesterol és incorporat al pool de colesterol intracel·lular. L'expressió del LDLr està estrictament regulat en funció del colesterol intracel·lular, és a dir, quan una cèl·lula obté suficient colesterol per les seves necessitats metabòliques, l'expressió del LDLr en membrana es redueix per un mecanisme de control transcripcional. Els factors de transcripció principalment involucrats en la inhibició transcripcional del LDLr pertanyen a la família dels "esterol regulatory element binding proteins" (SREBPs) [36].

Així doncs, la regulació del LDLr en el macròfag té una importància rellevant durant el procés aterogènic, gràcies a la seva capacitat de controlar els nivells de colesterol intracel·lular del macròfag, i per tant participant en la formació del macròfag escumós.

2.1.1. Modificació de les lipoproteïnes.

Un dels primers esdeveniments que porten a la iniciació de l'aterogènesi és l'acumulació de LDL en la paret vascular i la posterior modificació d'aquestes LDLs. En resposta a l'acumulació de mLDL es desenvolupen els diferents estadis en l'aterosclerosi com són l'**alteració de la paret endotelial** de l'artèria [37] i la **formació del macròfags escumós** [38, 39].

Una característica comuna en les mLDL és que la càrrega positiva de l'apoB queda emmascarada, esdevenint una molècula carregada negativament o molècula polianiònica. A nivell fisiològic s'han descrit diferents mecanismes responsables de les modificacions de la LDL. La teoria més acceptada durant anys ha estat que l'LDL nativa es modifica un cop ha entrat a la paret arterial degut a l'acumulació i agregació de partícules LDL als proteoglicans (PG) presents en l'artèria [40, 41]. Aquestes LDL unides a PG semblen tenir una alta susceptibilitat a modificacions químiques com per exemple l'oxidació [41]. A més a més també hi poden participar cèl·lules capaces de secretar molècules responsables de la modificació de les partícules LDL. En aquest sentit l'any 1981, Henriksen i col·laboradors [42], van verificar que quan la LDL s'incubava amb cèl·lules endotelials durant almenys 12 o 18 hores, aquesta pateix una sèrie de canvis físics i químics degut als radicals lliures causats pel metabolisme cel·lular [42]. Posteriorment es va demostrar que les cèl·lules de múscul llis (SMC) en cultiu són capaces de provocar les mateixes modificacions en les LDL [43], i posteriorment s'ha comprovat que els monòcits i els macròfags també posseeixen aquesta capacitat [44]. Així doncs els radicals lliures capaços d'oxidar les LDL, poden ser generats a la paret arterial per cèl·lules endotelials, SMC o macròfags [45-47]. D'altra banda, també alguns enzims expressats a la paret arterial poden ser responsables de l'oxidació de l'LDL, com la mieloperoxidasa o varies lipooxigenases [48, 49].

En la majoria d'estudis *in vitro* de l'aterosclerosi s'obtenen les LDL modificades en el laboratori a partir de reaccions amb metalls de transició, incubant les fraccions de LDL purificades de sèrum humà amb concentracions micromolars de sulfat de coure creant les modificacions oxidatives de les LDL (OxLDL) o bé amb acetat sòdic creant les AcLDL. Els ions provinents dels metalls de transició indueixen la reacció de peroxidació de les cadenes lipídiques, i la posterior modificació química de la proteïna apoB .

2.1.2. Components biològics en l'OxLDL i activitat biològica.

Entre els components biològics generats durant les modificacions per oxidació de LDL s'inclou els productes dels fosfolípids, d'esfingolípids, d'àcid gras lliure... (**Taula 2**). Entre aquests cal destacar els oxisterols: derivats oxidats del colesterol que presenten un ampli rang d'activitats biològiques, com la regulació del metabolisme d'esfingolípids, agregació de plaquetes o bé apoptosi, però l'activitat més rellevant dels oxisterols rau en la regulació de l'homeòstasi del colesterol, activant els factors de transcripció de la família dels receptors nuclears LXR [50], factors de transcripció que seran explicats en capítols posteriors.

<i>Components Biològics</i>	<i>Efecte Biològic</i>
Productes fosfolípids	
<i>sn-2 cadena curta productes PAPC (POVPC,PGPC)</i>	<i>Adhesió de monòcits, inducció de IL8, activació de SREBP lligand de CD36</i>
<i>sn-2 productes Epoxi (PEIPC,PECPC)</i>	<i>Unió de monòcits, inducció de MCP-1, IL8</i>
<i>sn-2 productes hidroxí-acil i hidroperoxi LPC</i>	<i>??</i>
<i>LPC</i>	<i>Quimiotàctic per monòcits, augment de la regulació de citoquines molècules d' adhesió</i>
<i>Productes PAF-like (sn-1)</i>	<i>Agregació de plaquetes, efecte mitogènic, activació PPAR</i>
Productes esfingolípids	
<i>Ceramide, esfingosine, esfingosine fosfat</i>	<i>Agregació LDL</i>
	<i>Mitogènesis de SMC</i>
Productes d'àcid gras lliure (FFAs)	
<i>HODE, HPODE, HETE, HPETE Isosprostanes</i>	<i>Activació de PPAR, lligand G2A, adhesió monòcits, Inhibició de productes de superòxid (15HETE).</i>
<i>Aldehid lliures MDA, HNE</i>	<i>Inducció de COX-2, MCP-1,TGFβ1</i>
Oxisterols	
<i>7-keto, 7 αOH, 24OH, 25OH, 27OH col.</i>	<i>Inhibició de la síntesis d' esterols, efflux d'esterols.</i>
<i>Èsters de colesterol hidroperoxides</i>	
Modificacions ApoB	
<i>Adducte de lisina, tirosina, cisteina</i>	<i>Antigenicitat, reconeixement dels Receptors Scavenger, pèrdua del reconeixemet pel receptor LDL</i>

Taula 2. Components de les OxLDL i les seves funcions biològiques conegudes. Adaptat de Levitan i col·laboradors Antioxid Redox Signal 2009 [51].

2.2. Tipus cel·lulars implicats en la lesió ateroscleròtica.

En la lesió ateroscleròtica hi participen tant cèl·lules constituents de la paret arterial (cèl·lules endotelials i cèl·lules del múscul llis), com cèl·lules presents en la circulació sanguínia [principalment leucòcits (monòcits i limfòcits) i plaquetes] [52].

Les cèl·lules endotelials formen l'endoteli vascular que actua com a primera barrera de la paret arterial, protegint l'íntima endotelial. L'endoteli és una barrera permeable i selectiva a través de la qual s'intercanvia molècules amb el plasma. Es tracta d'un teixit dinàmic que respon a diferents estímuls, com les substàncies que modulen el seu to, estructura i funció vascular i substàncies que influeixen en el creixement i/o apoptosi cel·lular. L'endoteli vascular té un paper important en l'homeòstasi vascular, manté l'equilibri entre la vasodilatació i la vasoconstricció, inhibint la proliferació o migració de cèl·lules del múscul llis [53] i la trombogènesi i fibrogènesi [54]. Quan no existeix aquest equilibri, es produeix el **dany endotelial**, principalment degut a factors metabòlics (com la hipercolesterolèmia), mecànics (hipertensió), immunològics (dèposits d'immunocomplexes) i químics (monòxid de carboni, nicotina) entre altres [55].

Durant el procés de l'aterosclerosi es pot produir el dany endotelial en la paret arterial en resposta a una lesió provocada per un excés de mLDL. En aquest context les cèl·lules endotelials són capaces d'activar la resposta inflamatòria alliberant citocines com IL-6 [56], quimiocines com MCP-1 [57], factors de creixement com M-CSF [56, 58] i expressant molècules d'adhesió com VCAM-1, PCAM-1, ICAM-1, P-selectina, E-selectina [59] i d'aquesta manera atreure altres cèl·lules implicades en el procés d'aterosclerosi com els leucòcits; principalment cèl·lules mononuclears, monòcits i limfòcits cap a la paret vascular [37] desencadenat així la resposta inflamatòria característica de l'aterosclerosi.

Les cèl·lules del múscul llis (SMC) són el tipus cel·lular majoritari de la paret vascular sana, representant el 90-95% del component cel·lular, percentatge que decau fins a un 50% en les plaques ateroscleròtiques avançades [60]. Durant l'aterogènesi, en resposta a factors quimiotàctics i de creixement, les SMC poden migrar de la capa mitja arterial cap a l'íntima on proliferaran, essent capaces d'acumular en excés mLDL, i a la vegada augmenten la secreció de components de la matriu extracel·lular com col·lagen i PG [61], creant un cercle viciós que amplifica i perpetua la reacció inflamatòria focalitzada en la placa d'ateroma. En aquest context les SMC, generalment de fenotip contràctil en la paret vascular,

són capaces de canviar el fenotip cap a osteoblast i expressar proteïnes específiques de l'ós [62, 63].

Les plaquetes, presents a la circulació sanguínia també poden adherir-se a la lesió ateroscleròtica contribuint a la seva evolució amb l'alliberació de nous factors de creixement i provocant la formació del trombe [64]. Un cop activades, les plaquetes són capaces de produir altes quantitats de citocines com IL-1 β i TGF- β [64] i quimiocines, entre elles CXCL4 (PF4), CCL5 (RANTES), CXCL7 (CTAP-III) i CXCL12 (SDF-1) [65]. Amb l'alliberament d'aquests mediadors inflamatoris es produeix el dany vascular. Les plaquetes activades també són capaces d'interactuar amb les cèl·lules endotelials i induir en aquestes l'expressió de molècules d'adhesió i quimiocines, que a la vegada incrementen el reclutament de més plaquetes circulants i agregació de leucòcits [66]. A més a més les plaquetes són capaces d'unir, captar i transportar mLDL [67].

Leucòcits: Entre la població de leucòcits, els macròfags són les cèl·lules predominants en les plaques ateroscleròtiques per la seva capacitat de transformar-se en macròfags escumosos, però altres poblacions cel·lulars del sistema immunològic innat o adaptatiu estan involucrats en modular la resposta dels macròfags a la retenció i modificació de LDL en la paret arterial, a més de modular la inflamació vascular crònica que caracteritza la patologia [68]:

-Neutròfils: Tot i que, generalment, els neutròfils no són detectats en les plaques ateroscleròtiques estables, es troben presents durant la ruptura de les plaques d'ateroma en pacients amb síndrome coronari agut [69]. A més a més, els neutròfils activats són capaços de secretar mieloperoxidasa, la qual pot contribuir a augmentant la captació del macròfag mitjançant la modificació de les LDL [70].

-Limfòcits: Els limfòcits T i B han estat implicats en l'aterogènesi per la seva capacitat de secretar citocines, quimiocines, factors de creixement, factors de coagulació, enzims proteolítics i per la producció d'immunoglobulines [71-73]. Així doncs, tot i que els limfòcits es troben presents en quantitats molt baixes en la placa d'ateroma [71, 74, 75] aquests són capaços de modular la progressió de la patologia.

-Cèl·lules dendrítiques: S'ha observat la presència de cèl·lules dendrítiques en plaques aterosclèrotiques d'humans i de ratolí [76, 77]. De fet, s'ha observat que les cèl·lules dendrítiques colocalitzen amb els limfòcits T en les regions de ruptura de les plaques [78] suggerint que la presentació antigènica i coestimulació de les cèl·lules dendrítiques en les plaques d'ateroma condueixen a l'activació dels limfòcits T, i d'aquesta manera participen en la desestabilització de la placa d'ateroma i conseqüent trombosis. Per altra banda, les cèl·lules dendrítiques del vas sanguini són capaces d'expressar C1q del sistema de complement, el qual facilita la deposició de complexos immunològics en la placa d'ateroma [79]. A més a més, les mLDL presents en la placa, promouen la maduració dels monòcits cap a cèl·lules dendrítiques madures [80] i a la vegada augmenten l'expressió de molècules de presentació antigènica i molècules coestimuladores en les cèl·lules dendrítiques madures [81].

-Cèl·lules Natural Killer, NK: La implicació de les cèl·lules NK en l'aterogènesi és poc coneguda, tot i que alguns treballs han estat capaços d'observar la presència de NK en les lesions ateroscleròtiques en humans [82, 83] així com la presència de quantitat elevades de cèl·lules NK circulants en pacients amb aterosclerosi severa [84]. Segons aquests estudis es suggereix que les cèl·lules NK podrien estar implicades en la patogènesi de l'aterosclerosi, però se'n desconeix el mecanisme.

-Cèl·lules NKT: Mitjançant la utilització de models murins s'ha suggerit com la propietat més plausible de relació entre la població de cèl·lules NKT amb l'aterosclerosi és l'habilitat de les cèl·lules NKT en reconèixer antígens lipídics i glicolípid presentats per les molècules CD1d [85]. D'aquesta manera s'hipotitza que les cèl·lules NKT podrien reconèixer els antígens lipídics oxidats en les plaques d'ateroma i ser activades. Però l'evidència directa entre NKT i aterosclerosi està limitada a molts pocs estudis.

-Monòcit-Macròfag:

El macròfag és el tipus cel·lular amb més protagonisme en el desenvolupament de la placa d'ateroma, i és per aquest motiu el centre de la tesi presentada.

Com totes les cèl·lules dels sistema immunològic, els macròfags tenen el seu origen en la medul·la òssia, on les cèl·lules mare hematopoietiques es diferencien a monòcits. En adults, la medul·la òssia produeix de 5 a 10^9 monòcits diaris, però la majoria d'ells moren per processos apoptòtics [86]. En condicions normals, alguns d'aquests monòcits són capaços de sortir de la medul·la òssia i viatjar per la sang cap als diferents teixits del cos.

Un cop en el teixit, un petit nombre de monòcits es diferencien a macròfags sota la influència de citocines, i depenent del teixit, en cèl·lules de la micròglia en el sistema nerviós, en osteoblast de l'ós, en cèl·lules de Langerhans de la dermis o cèl·lules de Kupffer del fetge, entre d'altres. Durant la diferenciació, els macròfags adquireixen la morfologia i bioquímica pròpia d'un macròfag diferenciat tal com un augment del contingut lisosomal, quantitat d'enzims hidrolítics i del nombre i grandària de mitocondris, així com el seu metabolisme energètic i de la capacitat fagocítica [87]. Els macròfags consten d'un fenotip molt heterogeni la qual cosa té importants implicacions funcionals [88]. Els macròfags són doncs cèl·lules versàtils amb múltiples funcions: reconeixent, fagocitant i eliminat de l'organisme agents patògens i cossos apoptòtics. També estan involucrats en la resolució de la inflamació, promovent directament la reparació dels teixits malmesos, i en aquest context són capaços d'induir la síntesi de proteïnes de la matriu extracel·lular i l'angiogènesi.

Aquesta elevada variabilitat fenotípica depèn directament del teixit en el qual es trobin i és el resultat dels diferents estímuls que rep el macròfag en el seu ambient [89]. Segons el tipus d'activació que reben, els macròfags han estat classificats en dos grans grups funcionals; els macròfags M1 i M2[88, 90]:

Macròfags M1:

Es denomina activació Clàssica o M1 del macròfag a l'activació del macròfag induïda per l'exposició a $IFN\gamma$ (citocina produïda per les cèl·lules NK i cèl·lules T), per les citocines IL-12 i IL-18, les quals són produïdes per cèl·lules presentadores d'antígens (APCs) i citocines secretades per limfòcits activats amb $IFN\gamma$ o IL-12, per citocines com GM-CSF secretada per macròfags, cèl·lules T, mastòcits, cèl·lules endotelials i fibroblasts, o bé per $TNF\alpha$ produït principalment per macròfags. També poden ser activats per productes microbians, com lipopolisacàrids (LPS). Els macròfags M1 tenen la capacitat de produir gran quantitat de citocines pro inflamatòries com IL-12, IL-23, grans quantitats de productes intermediaris de nitrogen o d'oxigen reactiu (NO) i ROS i poca quantitat de citocines antiinflamatòries com IL-10. En aquest context es promou la inflamació i es permet el reclutament de neutròfils, facilitant l'eliminació de patògens microbians, paràsits intracel·lulars o bé cèl·lules tumorogèniques o infectades [91-93].

Macròfags M2:

El fenotip de diferenciació M2 es deu principalment a l'activació per les citocines IL-4 i IL-13. A més a més, una gran varietat de cèl·lules que produeixen IL-4 i IL-13 com basòfils,

o cèl·lules “natural helper” poden contribuir a la polarització cap a M2 [94, 95]. A part de IL-4 i IL-13, altres citocines poden regular la diferenciació a M2 com IL-10, IL-21, GM-CSF, IL-33 o bé hormones glucocorticoides [96, 97]. Contràriament al macròfag M1, el macròfag M2 té la capacitat de produir nivells baixos de IL-12 o IL-23, i altes quantitats de IL-10, a més exhibeix alts nivells del Receptor Scavenger-A (SR-A), CD163 [98], o bé el receptor de manosa (MR) [99, 100]. A diferència dels macròfags M1, els macròfags que reben una activació alternativa o macròfags M2 no són capaços de produir NO i no aconsegueixen controlar el creixement de patògens intracel·lulars [101]. Els macròfags M2 tenen propietats antiinflamatòries, indueixen la tolerància i són capaços de promoure la reparació tissular [88]. També contribueixen en patologies com les al·lèrgies, asma i participen en processos de fibrosi. A més a més els macròfags amb fenotip M2 també regulen funcions metabòliques [102], com per exemple el manteniment de les funcions de l'adipòcit o bé modulant la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa, amb el qual es podria preveure el desenvolupament de l'obesitat induïda per la dieta [103].

2.2.1. Implicació del monòcit/macròfag en l'aterosclerosi

Transmigració del macròfag cap a la capa íntima. Implicació de les molècules d'adhesió, les quimiocines i les citocines.

Durant la lesió de la paret arterial en el procés ateroscleròtic, els monòcits migren cap a la paret arterial i són capaços de adherir-se a la superfície endotelial d'aquesta i transmigrar cap a la capa íntima arterial. Aquest fenomen és possible gràcies a la participació de les **molècules d'adhesió**. Inicialment els monòcits s'adhereixen de forma làbil a l'endoteli vascular, procés anomenat “rodament” o “adhesió rodant”. En aquest procés hi participen les selectines expressades per la cèl·lula endotelial (E i P –selectines Y). El rodament causa la disminució de la velocitat del monòcit i facilita la interacció entre les integrines expressades pel leucòcit i les molècules d'adhesió expressades per les cèl·lules endotelials activades, permetent així la unió entre cèl·lules [104]. Aquestes molècules d'adhesió formen part de la superfamília de les immunoglobulines i entre elles s'inclou la molècula d'adhesió intercel·lular de tipus 1 (ICAM-1) i la molècula d'adhesió vascular-1 (VCAM-1). Concretament, ICAM-1 s'uneix a les integrines leucocitàries CD18 i CD11a (LFA-1) o CD18 i CD11b (Mac-1) i és la responsable de l'adhesió de monòcits, limfòcits i neutròfils a les

cèl·lules endotelials [105, 106]. Per altra banda VCAM-1 s'uneix a l'integrina $\alpha 4/\beta 1$ (VLA₄) expressada en limfòcits i monòcits [107, 108]. Mitjançant estudis immunohistoquímics amb anticossos anti ICAM-1 i VCAM-1 s'ha observat l'expressió d'aquestes molècules d'adhesió en l'aorta i en les artèries coronàries humanes [59]. A més, alts nivells de ICAM-1 soluble són correlacionats amb un elevat risc d'infart de miocardi [109].

El concepte de migració dirigida dels leucòcits implica també l'acció de molècules proteiques conegudes com a **quimiocines** [110]. Entre el grup de quimiocines implicades en l'aterosclerosi es destaca IP-10, I-TAC, MIG i MCP-1. MCP-1 es troba expressat en les lesions ateroscleròtiques humanes enfront dels vasos sanguinis no implicats en l'aterosclerosi [57] (**Figura 6**).

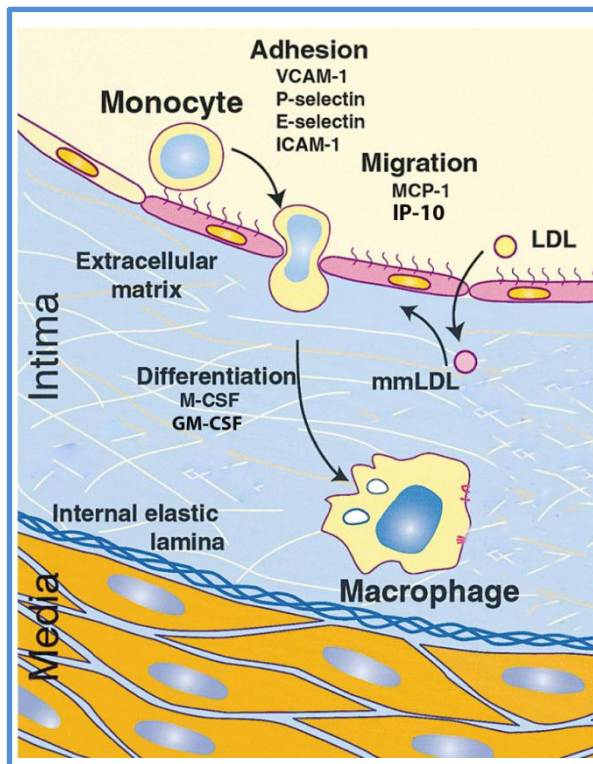


Figura 6. Mecanismes implicats en la migració i diferenciació dels monòcits a l'espai subendotelial.

Les LDL són susceptibles de patir processos de modificacions per oxidació en l'espai subendotelial de la paret arterial. Un cop les LDL esdevenen modificades són capaces d'atreure monòcits cap a les cèl·lules endotelials, augmentant les molècules d'adhesió i citocines inflamatòries. Els monòcits adherits són capaços de migrar a través de l'espai subendotelial i diferenciar-se a macròfags. Adaptat de Glass i col·laboradors. Cell, 2001 [111].

A part d'aquestes molècules d'adhesió i quimiocines en la lesió de la paret arterial també hi participen els **factors de creixement estimuladors de colònies (CSF)**. Els CSF són citocines que actuen com a factors de supervivència i/o factors de diferenciació, implicats en la maduració de les poblacions mieloides [112, 113]. S'han caracteritzat 4 membres CSF: **multi-CSF/ IL-3**, granulocyte macrophage-CSF (**GM-CSF**), macrophage-CSF (**M-CSF** o bé CSF-1) i granulocyte-CSF (**G-CSF**) [114].

En condicions patològiques d'aterosclerosi els factors de creixement M-CSF i GM-CSF es troben induïts en la pròpia capa íntima inflamada per l'acció de les mLDL [115], i el

seu paper en l'aterosclerosi rau en la capacitat d'augmentar la proliferació dels principals tipus cel·lulars implicats en la patologia.

El **M-CSF**, també anomenat CSF-1, és una sialoglicoproteïna homodimèrica. M-CSF s'expressa de forma constitutiva i ubiqua. Mitjançant estudis amb ratolins deficients pel gen M-CSF o bé amb anticossos neutralitzants del receptor de M-CSF, es va observar que M-CSF és capaç de generar colònies de macròfags a partir de precursors de medul·la òssia i que es requereix de M-CSF pel manteniment de certes poblacions de macròfags en els teixits [116, 117]. La importància del M-CSF en l'aterosclerosi es va demostrar després de realitzar estudis en ratolins deficients en **M-CSF**. En aquest model murí, caracteritzat per una carència de macròfags diferenciats en diversos òrgans i teixits, quan aquests ratolins es creuaven amb ratolins apoE^{-/-} la descendència presentava escasses lesions ateroscleròtiques [118]. A més a més, macròfags humans exposats a M-CSF incrementen dràsticament la captació d'OxLDL comparat amb els macròfags no exposat a M-CSF [119]. També, s'ha observat un augment de les concentracions de M-CSF en malalties coronàries en humans [120] i en l'espècie porcina [121]. Per altra banda, el factor de creixement **GM-CSF**, juga un paper important en la diferenciació i la formació de colònies de granulòcits (neutròfils, basòfils i eosinòfils) i monòcits [122]. És sintetitzat per macròfags, cèl·lules endotelials, fibroblasts i limfòcits [123] i té una funció pro inflamatòria [124, 125], a més d'estar implicat en processos de reconstrucció de teixits [92]. GM-CSF té una importància rellevant durant el procés d'aterosclerosi, ja que pot influenciar en processos com la mobilització cel·lular, actuant com a quimiocina atraient de neutròfils [126].

Formació del macròfag escumós

Un cop el macròfag ha transmigrat a l'espai subendotelial i esdevé diferenciat augmenta la seva capacitat endocítica. Entre alguns dels productes endocitats es troba el colesterol: lípids i lipoproteïnes (LDL). Mitjançant l'absorció de LDL el macròfag obté el colesterol necessari per les seves funcions metabòliques, però en condicions patològiques com d'aterosclerosi les LDL són acumulades a l'íntima arterial i esdevenen modificades a mLDL, com s'ha explicat anteriorment, aquestes mLDL perden l'afinitat pel receptor de LDL, per contra poden ser captades sense control per una via alternativa; mitjançant els **Receptors Scavenger**, principalment CD36 i Receptor Scavenger A (SR-A) [127]. Els Receptors Scavenger incrementen la incorporació de les mLDL unes 100 vegades més que les lipoproteïnes no modificades pels seus respectius receptors de LDL i d'aquesta manera es

potencia l'acumulació massiva dels èsters de colesterol al citoplasma dels macròfags, formant així els macròfags carregats de lípids o bé **macròfags escumosos** [39].

El macròfag escumós juga un paper crucial en la iniciació i en el desenvolupament de la placa d'ateroma. Un fet rellevant és que les mLDL poden ser citotòxiques pels macròfags [128]. En aquest sentit l'apoptosi induïda per les mLDL sobre el macròfag escumós pot participar en el desenvolupament de la placa d'ateroma depenent de l'estat de la lesió ateroscleròtica on es produeixi [129-131]. En els primers estadis de la malaltia, els macròfags escumosos secretarien citocines pro inflamatòries responsables del reclutament d'altres cèl·lules del sistema immunitari, com cèl·lules T [111, 132], participant en la formació de la placa d'ateroma. En aquest estadi de l'aterosclerosi, l'apoptosi del macròfag escumós jugaria un paper protector, suprimint la resposta immunològica [133]. En canvi, en les lesions més avançades l'apoptosi del macròfag promouria el desenvolupament i posterior ruptura de la placa d'ateroma [134].

Per mantenir l'homeòstasi lipídica, el macròfag depèn de l'existència de mecanismes d'exportació de l'excés de colesterol intracel·lular cap a l'espai extracel·lular, concretament cap a molècules HDL, mitjançant els transportadors lipídics ABCA1, ABCG1 o SR-B1, aquest fenomen s'anomena **eflux de colesterol**. L'habilitat per a que un macròfag esdevingui un macròfag escumós es deu al balanç entre la capacitat del macròfag per captar mLDL mitjançant els Receptors Scavenger i per expulsar-les segons l'activitat de l'eflux de colesterol (**Figura 7**) [111].

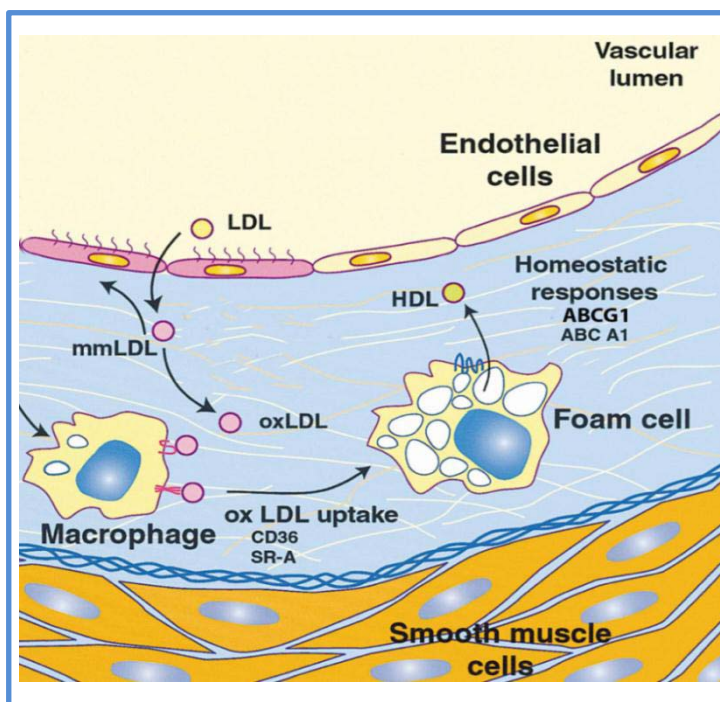


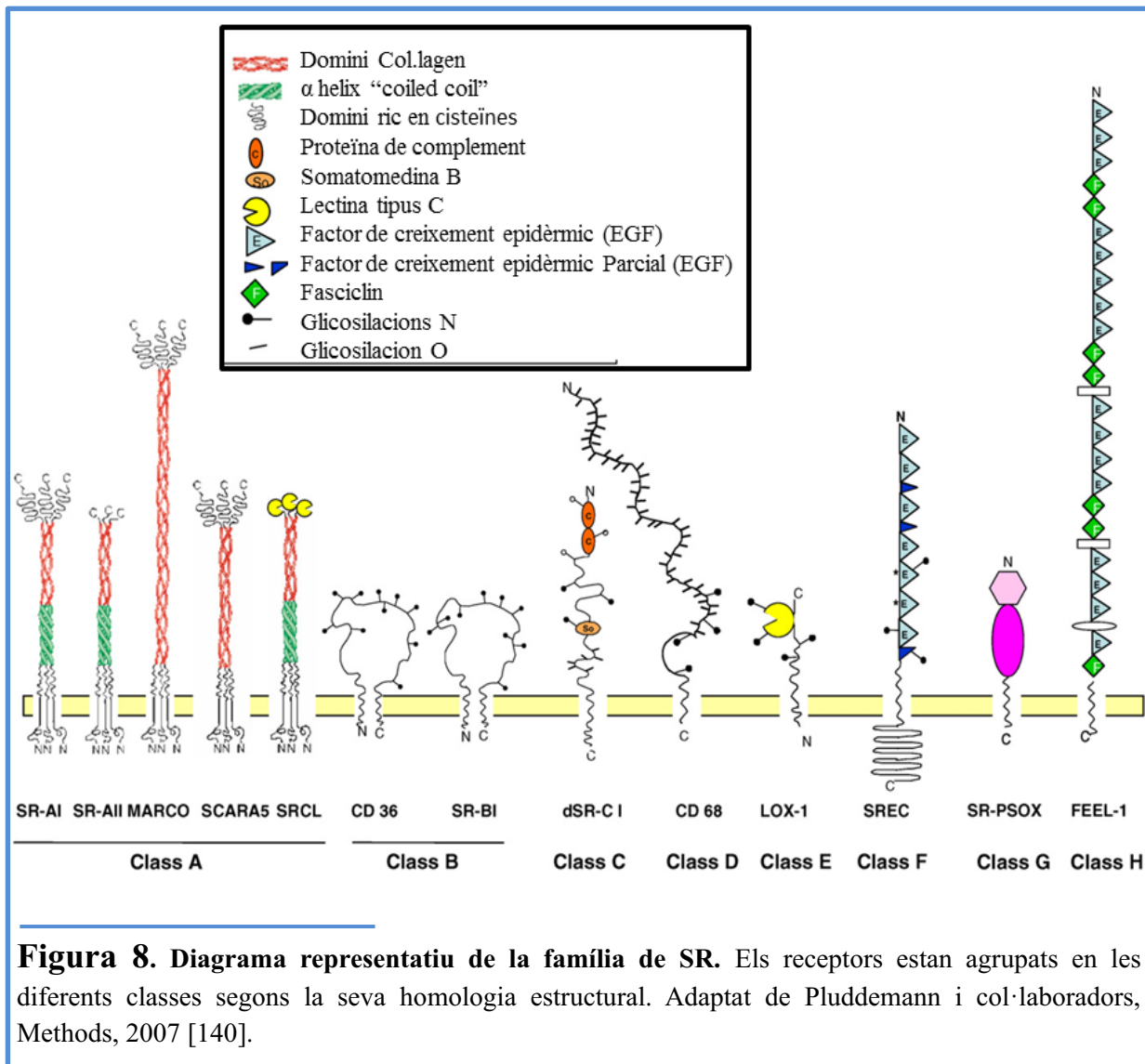
Figura 7. Formació del macròfag escumós en les lesions ateroscleròtiques.

Els macròfags en l'espai subendotelial són capaços de captar l'OxLDL mitjançant els Receptors Scavenger, principalment CD36 i SR-A, formant els macròfags escumosos (Foam Cells), el colesterol captat pel macròfag pot ser exportat cap a l'espai extracel·lular mitjançant transportadors lipídics com ABCA1 i ABCG1. Adaptat de Glass i col·laboradors. Cell, 2001 [111].

2.3. Els Receptors Scavenger, principals mediadors de la captació de mLDL.

Els Receptors Scavenger (SR) són glicoproteïnes de membrana o solubles els quals formen una família molt àmplia i que comprenen receptors amb estructures molt diverses. Existeixen 8 subgrups, classificats de la A a la H segons la seva estructura terciària. Poden contenir estructures de col·lagen, lectines del tipus C o bé de dominis rics en cisteïnes (SRCR) [135] (**Figura 8**). Els SR s'expressen principalment en macròfags [39] però també en altres tipus cel·lulars com cèl·lules dendrítiques, cèl·lules endotelials o bé cèl·lules musculars llises.

Els SR són capaços de reconèixer un ampli rang d'estructures pròpies de l'hoste com col·lagen, trombospondina i xaperones, a més de molècules modificades pròpies de l'hoste (damage-associated molecular patterns; *DAMPs*) com les mLDL, les quals presenten la càrrega negativa incrementada o polianióniques [39, 136]. A més també actuen com a receptors PRRs, de l'anglès Pattern Recognition Receptor, ja que són capaços de reconèixer patrons de productes conservats de patògens microbians, no compartits per l'hoste, anomenats pathogen-associated molecular patterns; PAMPs, com el lipopolisacàrid (LPS), l'àcid lipoteicoic (LTA), el DNA CpG bacterià i el zimosan en llevats [19]. Els SR exerceixen múltiples funcions, a part de la seva participació en el desenvolupament de l'aterosclerosi [136], també participen en la regulació de la diferenciació de les cèl·lules epitelials, fagocitosi de patògens i cèl·lules apoptòtiques [137], modulació de la senyal inflammatòria en els receptors Toll-Like Receptors (TLR) [138] i la presentació d'antigen a cèl·lules dendrítiques (DC) [139].



Els SR capaços de reconèixer lipoproteïnes, són SR-A, MARCO, CD36, SR-B1, LOX-1, entre altres, els quals són resumit en la **Taula 3**. D'aquests, els més estudiats són SR-A, CD36 i SR-B1, els quals detallarem a continuació.

-Scavenger Receptor A (SR-A): SR-AI humà consta de 1350 parells de bases [141], que transcriuen per una proteïna de 451 aa. SR-AII és codificat pel mateix gen, però tan sols consta de 1074 parells de bases com a conseqüència d'un "splacing alternatiu", de manera que resulta en una proteïna petita la qual no presenta el domini SRCR. Les dues isoformes SR-AI i SR-AII són anomenades com a SR-A o també MSR1, CD204 o SCARA1. El SR-A és una glicoproteïna de membrana de tipus II composta per una cua citoplasmàtica N-terminal, una regió transmembrana, una regió espaciador, una regió "Coiled Coil", domini amb similitud al col·lagen i regió del tipus C-terminal. El domini transmembrana conté 26-28 aa i el domini

citoplasmàtic N-terminal comprèn aproximadament 50aa [142, 143]. SR-A forma trímers i és capaç d'unir-se a un ampli rang de molècules, principalment polianióniques i moltes d'aquestes amb estructures repetitives, permeten així el contacte entre SR-A amb múltiples llocs d'unió [144]. Entre aquests lligands s'inclou les mLDL, com les AcLDL i OxLDL, encara que presenten major afinitat per les primeres [145], lípids presents en la superfície bacteriana i alguns agregats de nucleòtids [125, 146].

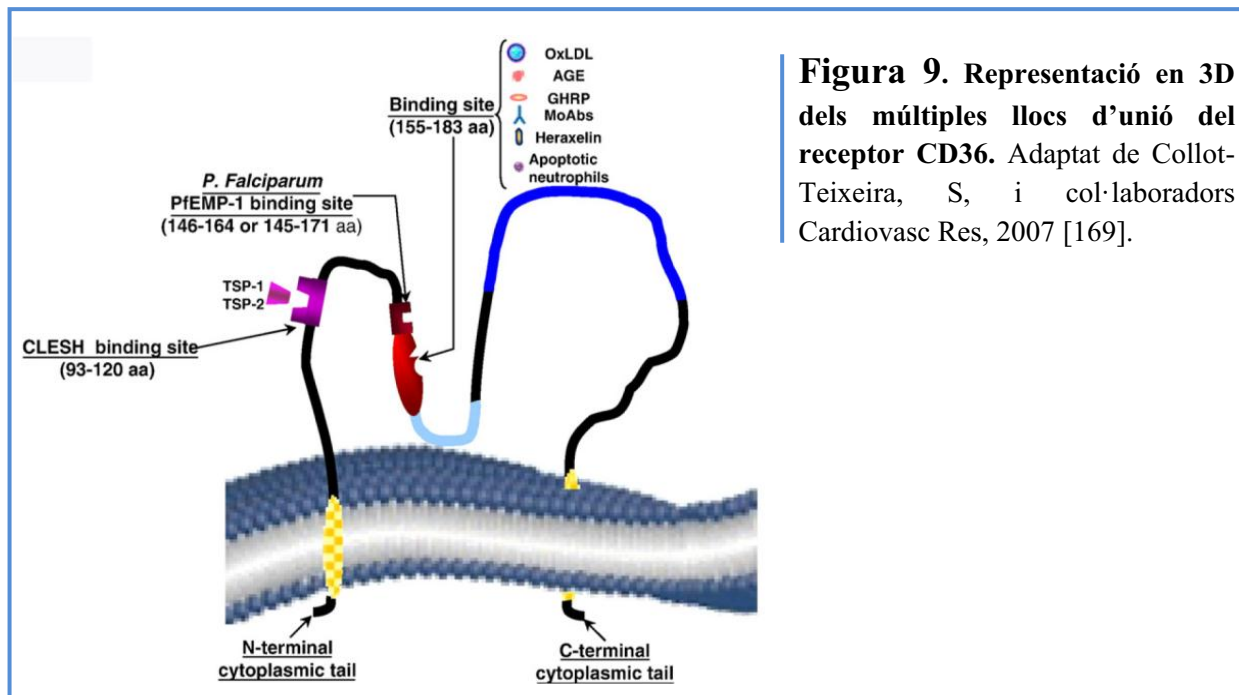
La funció de SR-A en la captació de mLDL i la formació de cèl·lules escumoses suggereix un paper aterogènic per aquest receptor. Per confirmar la implicació de SR-A en processos ateroscleròtics es van generar animals deficientes en el receptor SR-A i es van creuar amb models murins susceptibles a l'aterosclerosi. En estudis inicials realitzats en ratolins apoE^{-/-} [147] o LDLr^{-/-} [148], l'eliminació de SR-A va resultar en una reducció de la grandària de la lesió. A més a més, s'ha demostrat que SR-A s'expressa en la superfície cel·lular de macròfags escumosos i la seva presència s'ha detectat en plaques ateroscleròtiques [149].

Així mateix SR-A ha estat implicat en el reconeixement de patrons d'estructures patògenes així com en la fagocitosi d'algunes bactèries [150, 151], a més està implicat en l'entrada d'adenovirus en els macròfags [152]. El destí d'aquests microorganismes no està ben establert, ni tampoc es sap si es genera algun tipus de senyal intracel·lular que indueixi l'activació del sistema immunitari [125, 146].

En experiments *in vitro* en ratolins SR-A^{-/-} es va observar que aquest receptor és essencial per la defensa del hoste enfront d'infeccions com *L. monocytogenes* o Herpes simplex virus-1 [147], *S.aureus* [153] i *S. pneumoniae*, entre altres [154]. En la participació de SR-A en la defensa immunitària s'inclou la capacitat per modular la senyalització via TLR [155-157] a més a més participa en l'activació de les cèl·lules T mitjançant la presentació directa del lligand endocitat per SR-A [158, 159].

- **CD36:** És una glicoproteïna transmembrana de 88kDa, CD36 consta de dos dominis transmembrana localitzats a prop dels extrems N i C terminal, amb una sola cua citoplasmàtica a cada final. CD36 s'expressa en un ampli rang de tipus cel·lulars com l'endoteli microvascular, cèl·lules fagocítiques "professionals" com macròfags, cèl·lules dendrítiques (DC), micròglia, epíteli pigmentari de la retina, en precursors d'eritròcits: hepatòcits, adipòcits i també plaquetes; miòcits cardíacs o de l'esquelet, i especialment en l'epíteli mamari, en el ronyó i en l'intestí [160].

CD36 va ser descrit originalment com la principal glicoproteïna de membrana de les plaquetes [161], responsable de la unió amb la trombospondina [162] i també de la internalització de *Plasmodium falciparum* [163-165]. Però en l'última dècada s'ha identificat CD36 com a receptor capaç de reconèixer múltiples lligands (**Figura 9**), entre ells components de la paret bacteriana [138]; fosfolípid fosfatidil lisina (PS) i fosfolípid folsfatidillisisna oxidades (oxPS), (epítops expressats en la membrana de les cèl·lules apoptòtiques [90, 166]); també col·lagen [167] i OxLDL [168] entre altres. Aquesta habilitat en reconèixer múltiples lligands confereix a CD36 múltiples funcions, depenent del tipus cel·lular..



CD36 està implicat en la fagocitosi i la inflamació en resposta a patògens agressors [138, 170]. Per exemple, els ratolins deficientes en CD36 són més susceptibles a infeccions per *S. aureus* comparat amb els ratolins control, demostrant que CD36 és important en la defensa enfront de patògens bacterians [138, 171]. Anàlogament a la funció de CD14 en presentar l'LPS a TLR4, s'ha suggerit que CD36 actua com a proteïna accessòria per presentar bacteris així com proteïnes de l'hoste modificades a alguns TLRs. En aquest sentit, diferents estudis han suggerit que TLR2 i TLR4 requereixen de CD36 com a co receptor [138, 172, 173].

CD36 és a més un dels principals transportador d'àcids grassos (FA) de cadena llarga a través de membrana. Això es va observar per primer cop després del seu clonatge com a proteïna de membrana en adipòcits de rata [174]. Mitjançant estudis en cèl·lules murines del

múscul on, com a resultat de la sobre expressió de CD36, s'observà un increment en la captació de FA i emmagatzematge de triglicèrids (TG) [175]. Paral·lelament, en estudis amb ratolins deficients en CD36 s'observà una disminució en la captació de FA [176]. En aquests estudis s'evidencià que CD36 es troba íntimament lligat a la regulació de la captació de FA a través de la membrana i posterior metabolisme d'aquest. Així doncs CD36 juga un paper important en el dipòsit de greix a les cèl·lules hepàtiques, desenvolupant patologies hepàtiques com l'Esteatosi Hepàtica, anomenada altrament patologia del fetge gras [177].

A més a més, CD36 està fortament implicat en l'aterosclerosi ja que CD36 és receptor cel·lular per les formes mLDL, principalment OxLDL [178]. Concretament CD36 és, responsable de més del 50% de l'acumulació d'OxLDL pels macròfags humans i murins [127, 168, 179]. La capacitat de CD36 per captar i endocitar mLDL va ser descrita per primer cop per Endemann i col·laboradors, on mitjançant l'expressió de CD36 en la línia cel·lular epitelial humana de ronyó (HEK-293), s'observà la capacitat de CD36 en unir específicament OxLDL [168]. Actualment, existeixen nombrosos treballs corroborant aquesta funció de CD36. S'ha observat que els macròfags de pacients que presenten una deleció en l'exó 5 i una inserció en l'exó 10 del gen CD36 [179], així com els macròfags procedents de ratolins deficients en CD36 [176], mostren una menor capacitat d'unir i captar OxLDL. A més a més, els ratolins doblement deficients en CD36 i apoE desenvolupen menors lesions ateroscleròtiques que els corresponents ratolins control [180]. Per altra banda, mitjançant estudis immunohistoquímics, s'ha observat una elevada expressió de CD36 en els macròfags escumosos presents en lesions de l'aorta humana [181].

- **Scavenger Receptor class BI (SR-B1)**: És un Receptor Scavenger de classe B. És una glicoproteïna de 82kDa, consisteix en dos dominis citoplasmàtics, dos dominis transmembrana i una llarga regió extracel·lular en forma de "bucle" amb 9 possibles zones de N-glicosilació [182, 183]. SR-B1 es troba altament expressat en el fetge i en teixit esteroidogènic. S'uneix a un ampli rang de lipoproteïnes (HDL, LDL, VLDL) i també lipoproteïnes modificades (OxLDL i AcLDL). En aquest sentit, SR-B1 participa en la captació selectiva dels èsters de colesterol de les HDL [184] i també participa en l'eflux de colesterol cap a lipoproteïnes HDL [185]. D'aquesta manera SR-B1 està involucrat en el transport de colesterol bidireccional a través de la membrana cel·lular.

Classe	Receptor Scavenger	Lligand	Expressió	Participació en MCV?
A	SR-A	AcLDL, OxLDL, β -amiloide, xaperones, matriu extracel·lular, AGE, cèl·lules apoptòtiques, bacteris, cèl·lules B activades.	Macròfags, mastòcits, dendrítiques, cèl·lules endotelials i SMC.	Si, captació d'OxLDL pels macròfags (macròfag escumós)
A	MARCO	AcLDL, OxLDL, cèl·lules apoptòtiques, bacteris, cèl·lules B activades	Macròfags, cèl·lules dendrítiques.	No
B	SR-B	HDL, LDL, OxLDL, cèl·lules apoptòtiques.	Monòcits/Macròfags, hepatòcits i adipòcits.	Redueix l'aterosclerosi a través del transport de colesterol cap a HDL
B	CD36	AcLDL, OxLDL, HDL, LDL, VLDL β -Amiloide, AGE, cèl·lules apoptòtiques.	Macròfags, plaquetes, adipòcits, cèl·lules endotelials.	Si, captació d'OxLDL pels macròfags (macròfag escumós)
E	LOX-1	OxLDL, xaperones, ECM, AGE, cèl·lules apoptòtiques, bacteris, plaquetes activades.	Cèl·lules endotelials, SMC, macròfags, plaquetes.	Si, captació d'OxLDL per cèl·lules endotelials (disfunció endotelial)
F	SRECI/II	AcLDL, OxLDL, xaperones cèl·lules apoptòtiques.	Cèl·lules endotelials, macròfags.	Baixa captació d'AcLDL
G	SR-PSOX	OxLDL, bacteris.	Macròfags, SMC, dendrítiques, cèl·lules endotelials, cèl·lules B i T.	Si, captació d'OxLDL pels macròfags
H	FEEL-1/II	AcLDL, xaperones, matriu extracel·lular, AGE, bacteris.	Monòcits/Macròfags, cèl·lules ednotelials.	No

Taula 3: Representació dels principals Receptors Scavenger implicats en el reconeixement de lipoproteïnes, expressió i implicació en l'aterosclerosi. Adaptat de Stephen i col·laboradors Int J Hypertens, 2010 [186].

2.4. Regulació de l'eflux de colesterol: Els receptors nuclears

La capacitat d'eflux de colesterol per part del macròfag juga un paper important en el desenvolupament del macròfag escumós i és regulat per l'activació dels factors de transcripció anomenats **Receptors Nuclears (RN)** [187].

Els RN són factors de transcripció capaços d'activar o reprimir gens específics d'expressió en cèl·lules mieloides i limfoides [187]. La seva activació depèn de la unió als seus respectius lligands, a més la majoria de RN activen la transcripció formant dímers, ja sigui formant homodímer o heterodímer. Un cop activats adquireixen canvis conformacionals, i esdevenen capaços de unir-se al DNA de la regió promotora de diversos gens, permetent així la funció de factor de transcripció. La superfamília de RN inclou receptors d'hormones esteroides, com estrògens (ER) o receptors de glucocorticoides (GR), receptors per lligands no esteroïdals, com l'hormona tiroide (TR) i receptors d'àcid Retinoic (RXR). A més a més, inclou els receptors Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) i Liver X Receptors (LXR) els quals són activats per diversos productes del metabolisme lipídic com les formes oxidades del colesterol (oxisterols) i productes de biosíntesi del colesterol. Mitjançant estudis *in vitro* i *in vivo* s'ha observat que els receptors PPARs i LXRs necessiten formar heterodímer amb RXR per realitzar les seves funcions [188].

Retinoid X Receptors (RXRs): Existeixen diferents isoformes: RXR α ($\alpha 1$ i $\alpha 2$), RXR β ($\beta 1$ i $\beta 2$), i RXR γ ($\gamma 1$ i $\gamma 2$) [189]. RXR β es troba àmpliament expressat, gairebé en tots els teixits [190, 191]. RXR γ té una distribució restrictiva en els múscul i certes parts del cervell [191]. Pel que fa a RXR α és predominantment expressat en el fetge, ronyó, intestí i és el principal RXR expressat en l'epidermis [192]. RXRs és activat pels seus lligands; l'àcid 9-cis retinoic (9cRA) i pels àcids grassos poliinsaturats, PUFAs de l'anglès "long-chain polyunsaturated fatty acids". Respecte la seva funció es sap que RXR és necessari per la unió efectiva d'altres receptors nuclears al DNA, formant heterodímers nuclears.

Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs): Existeixen 3 subclasses de PPARs; α (NR1C1), δ (NR1C2) i γ (NR1C3) els quals tenen una distribució diferent en teixit. El PPAR α s'expressa en fetge, ronyó, cor i múscul i regula la producció d'enzims que participen en l'oxidació d'àcids grassos i en el metabolisme de les lipoproteïnes; PPAR γ es troba altament expressat en teixit adipós i cèl·lules d'origen mioeloides, com macròfags, i finalment el PPAR δ té una expressió ubíqua [193]. Els seus lligands són derivats oxidats dels

àcids grassos presents en les lipoproteïnes i els seus metabòlits. S'ha observat que l'expressió de PPAR γ es troba augmentat en els macròfags escumosos de les lesions ateroscleròtiques [194]. De fet PPAR γ promou la captació d'OxLDL augmentant l'expressió de CD36 [195] i per tant ajudant en el desenvolupament del macròfag escumós. Semblaria doncs que PPAR és un factor proaterogènic però estudis *in vivo* evidencien que contràriament té un efecte antiaterogènic. En aquests estudis, cèl·lules de la medul·la òssia deficientes en PPAR són trasplantades a models murins d'aterosclerosi, deficientes en LDLr [196] o bé deficientes en apoE [197], i l'anul·lació de PPAR en els macròfags resulta en un augment de la lesió ateroscleròtica. A més a més, l'activació de PPAR γ disminueix l'expressió del Receptor Scavenger SR-A [198] i augmenta l'expressió d'un altre RN amb efecte antiaterogènic: LXR α [199, 200].

Liver X Receptors (LXRs): Existeixen 2 subclasses LXR α (NR1H3) i LXR β (NR1H2). LXR α té una distribució específica de teixit, de manera que resulta més abundant en el fetge i altres teixits involucrats en el metabolisme lipídic, mentre que LXR β s'expressa en tots els teixits. Els lligands naturals de LXR, són les formes oxidades del colesterol; anomenats oxisterols, entre ells: 22(R)-hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol i àcid colestenoic [201, 202]. Mentre que entre els lligands sintètics de LXR s'inclou ATI-829 [203] o T0901317 [204] i GW3965 [205]. Els lligands sintètics de LXR han estat desenvolupats com a drogues potencials pel tractament de malalties cardiovasculars i síndromes metabòlics. De fet els seus efectes han estat efectius en tractament amb models murins d'aterosclerosi [203], d'Alzheimer [206] o bé diabetis [207]. Malauradament, l'activació del LXR a la vegada també incrementen la síntesi de triglicèrids, cosa que impossibilita l'ús terapèutic dels lligands de LXR en l'aterosclerosi humana.

Mitjançant estudis *in vitro*, s'ha observat com els lligands sintètics de LXR incrementen l'eflux de colesterol [208]. Així mateix en estudis *in vivo*, el trasplantament de cèl·lules progenitores LXR deficientes en els models murins apoE $^{-/-}$ o bé LDL $^{-/-}$ s'observà un incrementen en la lesió ateroscleròtica. Segons aquests resultats es suggereix que l'activació de LXR exerceix una efecte protector durant l'aterosclerosi, impedit l'acumulació de l'excés de colesterol cel·lular i prevenint la formació del macròfag escumós [209]. Concretament, l'heterodímer LXR/RXR regula directament l'expressió de proteïnes que transporten el colesterol intracel·lular a l'exterior cel·lular participant així en el procés d'eflux de colesterol. Aquestes proteïnes transportadores de colesterol intracel·lular formen part de la família dels **transportadors lipídics ABC (ATP Binding Cassette)**.

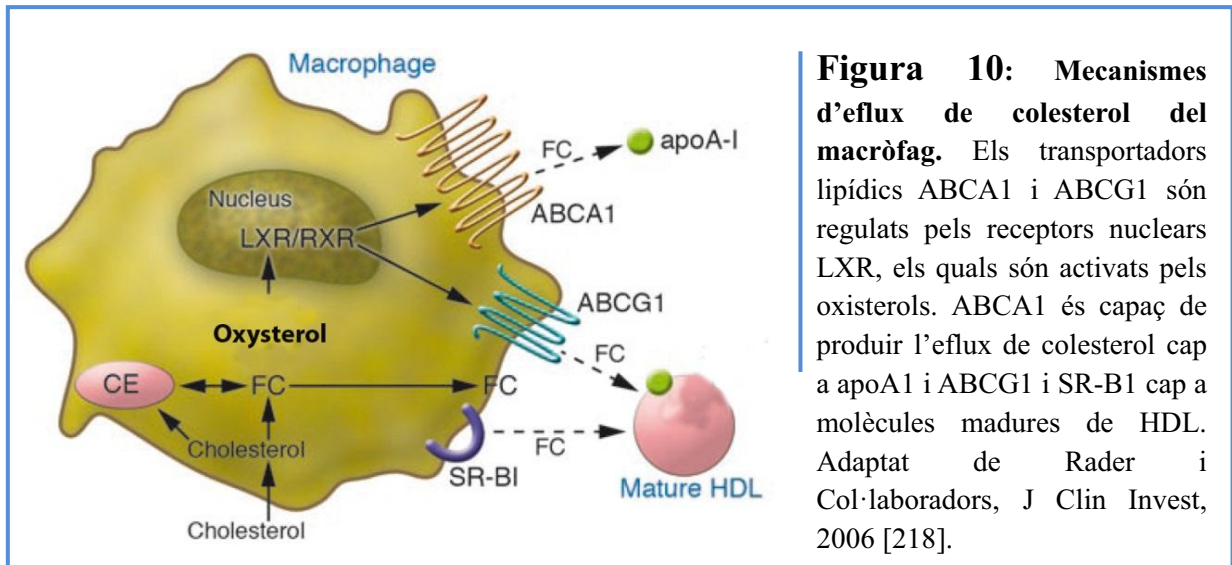
Els transportadors lipídics ABC

Els transportadors lipídics ABC són proteïnes integrades de membrana, aquestes contenen llocs d'unió a ATP i mitjançant l'ús de l'energia d'hidròlisi de l'ATP són capaces d'impulsar el transport d'una ampla gama de substrats, entre elles el colesterol lliure i fosfolípids des de l'interior de les cèl·lules cap a les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) presents en el sèrum, anomenades **acceptors lipídics**. Es coneixen 48 membres de la superfamília dels transportadors lipídics ABC i es divideixen en 7 subfamílies basant-se en anàlisis filogenètics, anomenats des de ABCA fins ABCG.

La proteïna **ABCA1** transporta fosfolípids intracel·lulars i colesterol lliure (FC) cap als acceptors lipídics composts d'apolipoproteïnes pobrament lipiditzades, com l'apolipoproteïna l'**apoA-I**, **apoC-II** o bé **apoE**. Entre aquestes apolipoproteïnes, l'apoA-I és la més abundant en el plasma humà ja que està present casi en forma total en les HDL. Gràcies a estudis utilitzant ratolins deficients en ABCA1 s'ha demostrat la implicació de ABCA1 en l'eflux de colesterol cap a apoA1 [210, 211]. S'ha observat que existeix una correlació inversa entre la concentració plasmàtica de l'apoA-I i la predisposició a les patologies coronàries [212, 213]. De fet la importància fisiològica de ABCA1 s'ha observat mitjançant estudis amb pacients amb malaltia de Tànger, pacients deficients en el gen ABCA1, en aquests pacients la susceptibilitat de desenvolupar aterosclerosi es troba incrementada [214].

La proteïna **ABCG1** transporta fosfolípids intracel·lulars i colesterol lliure (FC) cap als acceptors lipídics composts de partícules HDL madures les quals contenen fosfolípids. A diferència de ABCA1, la funció i importància de ABCG1 en l'homeòstasi *in vivo* és menys coneguda, però en estudis *in vitro* utilitzant ratolins deficients en ABCG1 es demostrà que ABCG1 juga un paper important en el control de lípids, facilitant la transferència de colesterol o molècules HDL [215]. De fet els ratolins deficients en ABCG1 presenten una gran acumulació de lípids neutres i fosfolípids en els hepatòcits i en els macròfags de diferents teixits després d'una dieta rica en greixos i colesterol [215]. Contràriament, els ratolins transgènics que sobre expressen ABCG1 en fetge (utilitzant Vectors ABCG1 recombinant) estan protegits d'aquesta acumulació [216].

A més a més, el Receptor Scavenger **SR-B1** també participa en el transport de colesterol gràcies a la seva implicació en l'eflux bidireccional de les lipoproteïnes. Es a dir, el colesterol surt del macròfag a través de SR-B1 cap a molècules HDL i posteriorment aquest colesterol pot ser captat a través del mateix receptor SR-B1 [217].

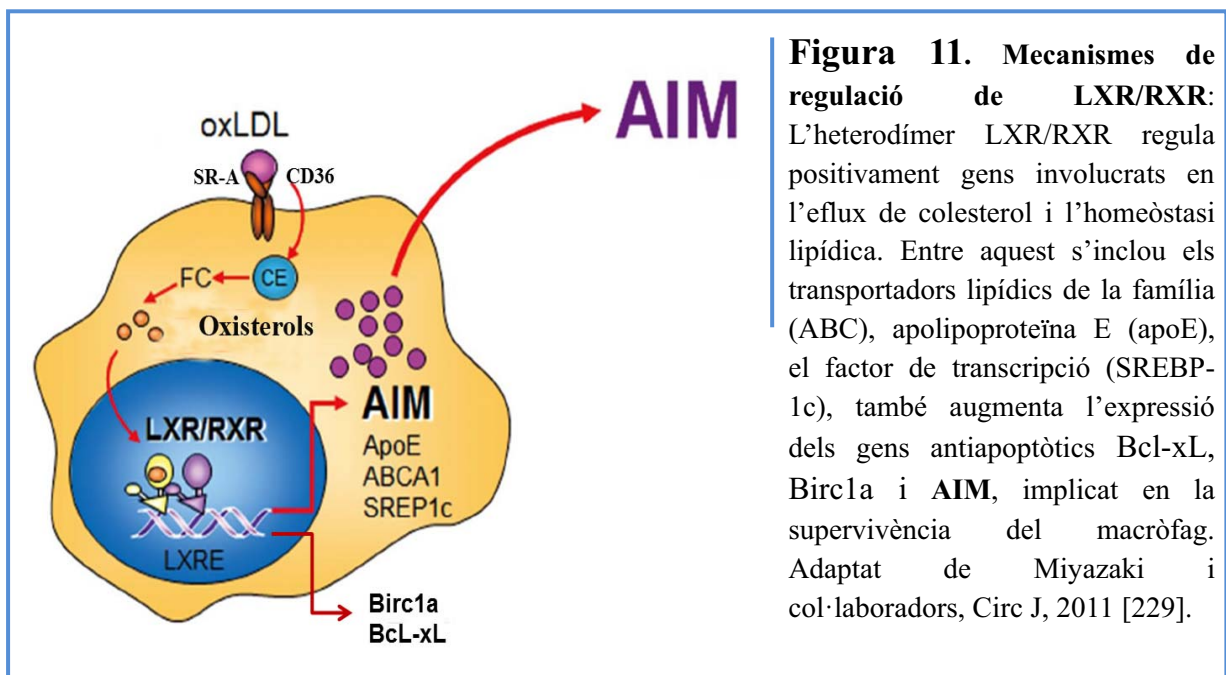


2.4.1. Acció antiinflamatòria i antiapoptòtica dels receptors nuclears.

En el context de l'aterosclerosi, l'activació de LXR i de PPAR γ per les formes oxidades de LDL o pels seus lligands sintètics exerceixen un efecte antiateroscleròtic no solament promovent l'eflux de colesterol sinó també suprimint la resposta inflamatòria en la paret arterial [194, 219]. Els lligands naturals i sintètics per **PPAR γ** exerceixen efectes antiinflamatoris en diferents models d'inflamació [199]. De fet els lligands per PPAR γ inhibeixen l'expressió dels gens inflamatoris induïts per IFN γ i LPS [220]. Concretament l'activació de PPAR γ inhibeix la producció de citocines inflamatòries com TNF α , IL6 i IL1 [199, 211, 215, 221].

Per altra banda, l'activació de **LXR**, al igual que PPAR γ , exerceix un control negatiu en la resposta inflamatòria. Els lligands de LXR inhibeixen la resposta dels macròfag enfront de patògens bacterians, com per exemple l'estimulació per LPS, inhibint l'expressió de gens pro inflamatoris en el macròfag, entre aquests, mediadors inflamatoris com iNOS, COX-2 i IL-6, quimiocines com MCP-1 i -3, MIP-1 i IP-10 [219, 222]. En estudis *in vivo*, els lligands de LXR inhibeixen l'expressió de gens implicats en la inflamació de l'aorta de models murins ateroscleròtics [223, 224]. Així doncs LXR actua com a regulador negatiu de l'aterogènesi, ja que l'activació de LXR influeix en l'expressió de proteïnes transportadores de colesterol i per altra banda també modula l'expressió de gens involucrats en la inflamació. D'aquesta manera LXR s'ha considerat com a factor connector entre el metabolisme lipídic i les funcions immunològiques en el macròfag.

A més, durant l'activació del heterodímer LXR/RXR, es regula l'expressió de gens implicats en la supervivència del macròfag enfront dels efectes apoptòtics dels patògens. L'activació de LXR/RXR pel seus lligands sintètics contribueix en l'efecte antiapoptòtic del macròfag inhibint l'expressió de gens proapoptòtics com Caspasa 1, 4/11 i augmentant l'expressió de 3 gens antiapoptòtics: Bcl-xL: membre antiapoptòtic de la família de Bcl2 [225], Birc1a: Inhibidor de l'activitat de la Caspasa 3 i 7 [226] i el Receptor Scavenger ric en Cisteïnes (SRCR-SF) AIM [227, 228].



3. La proteïna Apoptosis Inhibitor of Macrophages.

AIM (Apoptosis Inhibitor expressed by Macrophages), també anomenada Sp α (Secreted Protein Alpha), ApiA6 o bé CD5-like molecule (CD5L) és una glicoproteïna soluble expressada i secretada per macròfags que pertanyen a la família dels Receptors Scavenger rics en Cisteïnes (Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily, SRCR-SF) [144].

Els membres de la família SRCR-SF, es caracteritzen per tenir una o varies repeticions d'un domini d'uns 110 aminoàcids ric en cisteïnes, denominat SRCR. Els SRCR-SF poden ser proteïnes de membrana i/o secretades per cèl·lules hematopoètiques o no, en estat embriogènic o estat adult [144]. Els SRCR-SF han estat classificats en dos grups, A i B, depenent del nombre de residus de cisteïnes en cada domini SRCR, i per la seva organització intró-exó. El Grup A inclou els membres que posseeixen 6 cisteïnes en els seus dominis SRCR, cada un dels quals és codificat per almenys 2 exons. Membres d'aquest grup són Scavenger Receptor A (SR-AI), Macrophage Receptor with Collagenous Domain (MARCO) o Mac 2 Binding Protein (Mac2Bp). Mentre que els dominis del Grup B generalment consten de 8 residus de cisteïnes i estan codificats per un sol exó. Dins d'aquest grup s'inclou CD5, CD6 [230] o bé AIM [231]. Per altra banda membres del Grup A generalment estan compostos per un ventall de multidominis, dominis SRCR associats a altres dominis funcionals, com per exemple dominis enzimàtics (proteases) o regions de col·lagen. Per contra els membres del Grup B estan formats per repeticions de dominis SRCR (**Figura 12**).

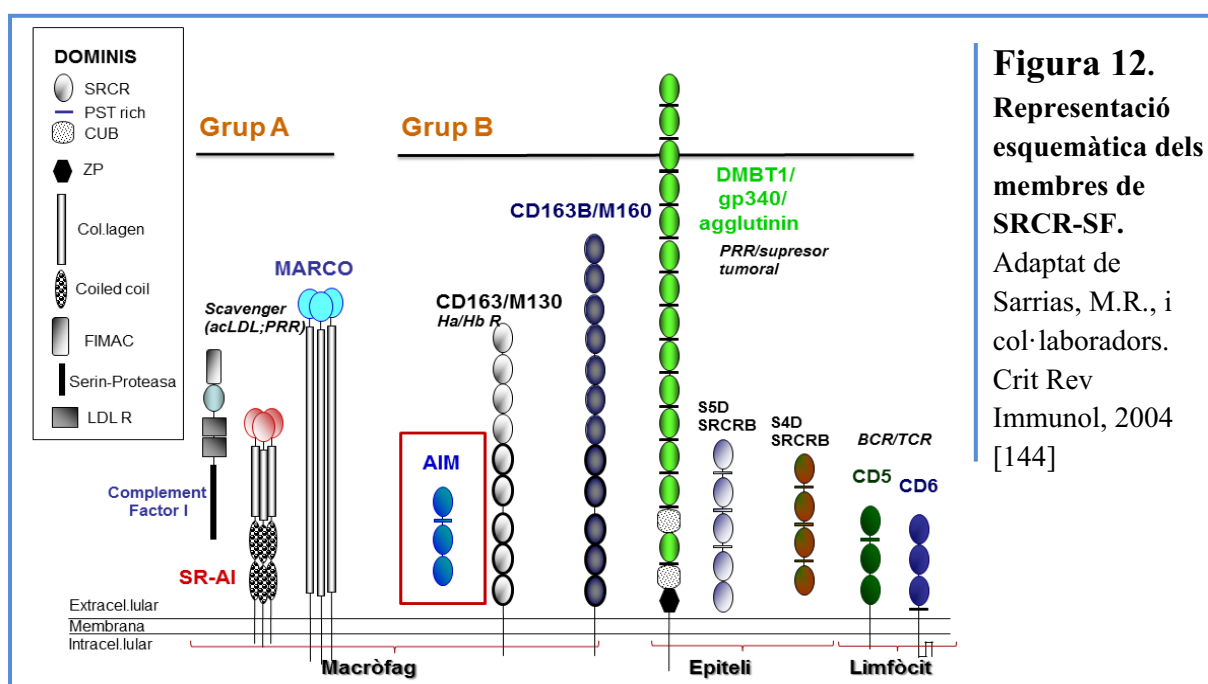


Figura 12.
Representació esquemàtica dels membres de SRCR-SF. Adaptat de Sarrias, M.R., i col·laboradors. Crit Rev Immunol, 2004 [144]

Pel que fa a l'expressió d'AIM, anàlisi per Northern Blot han detectat transcrits d'AIM en teixits limfoides diferents en humà i ratolí. El RNA missatger (mRNA) de la forma humana d'AIM (hAIM) es troba expressada en els teixits limfoides (medul·la òssia, ganglis limfàtics, melsa i fetge fetal) [231]. En canvi la forma murina d'AIM (mAIM) està fortament expressat en cèl·lules adherents del exsudat peritoneal, les qual són majoritàriament macròfags i dèbilment expressat en la melsa, timus i fetge [232]. També existeixen diferències a nivell transcripcional, trobant 3 transcrits de mRNA en teixit limfoide humà respecte a un únic transcrit en teixit de ratolí, intuïnt així una diferència en la regulació transcripcional de les dues espècies [231, 232].

Tant la forma humana com murina d'AIM contenen 3 dominis SRCR i comparteixen una elevada homologia a nivell aminoacídic (69% identitat, 80% similitud). El pes molecular predictiu de les seves seqüències és de 37 kDa, però s'ha detectat AIM en sèrum de ratolí i humà amb diferent pes molecular [233]. En humans s'han definit dues isoformes de 38 i 40 kDa, resultat de diferent contingut d'àcid siàlic [233]. Per contra el pes molecular de la forma murina augmenta a 52 kDa. Aquestes observacions reflecteixen diferències importants en els processos de glicosilació entre la forma humana i la murina d'AIM, i es va suggerir que podrien resultar en diferències en la seva funcionalitat [233]. De fet, recentment, un estudi confirmava la importància de la glicosilació en N de mAIM (absent en hAIM) per la seva secreció i funcionalitat [234].

Pel que fa a la regulació de l'expressió d'AIM, en el ratolí aquesta és regulada per l'activació de l'heterodímer LXR/RXR per formes oxidades del colesterol (OxLDL) [235], pels seus lligands sintètics T1317, 9cRA, GW3965 [227, 228] o pel seu lligand endogen natural: l'enzim colesterol-25-hidroxilasa (CH25H) [236]. Recentment s'ha publicat que mAIM també es troba sota la regulació del factor de transcripció SREBP-1a [237]. En aquest sentit, és important destacar que l'expressió de mAIM desapareix quan els macròfags són cultivats *in vitro*, suggerint així que es requereix d'un ambient específic per l'expressió de mAIM. De fet, l'expressió de mAIM en condicions *in vitro* no s'observa modulada per cap factor conegut capaç d'estimular els macròfags, com podria ser PMA, LPS o diverses citocines [238].

mAIM està implicat en un ampli rang de funcions biològiques. Estudis previs han demostrat que prevé l'apoptosi dels macròfags i altres tipus cel·lulars. La funció antiapoptòtica de mAIM, va ser per primer cop descrita el 1999 per Miyazaki i col·laboradors on mitjançant estudis *in vitro* i *in vivo* en ratolins deficientes en mAIM s'observà que el seus timòcits eren altament susceptibles a l'apoptosi induïda per varis estímuls, com la

dexametasona i les irradiacions γ [238]. mAIM no solament inhibia l'apoptosi en timòcits sinó que també en macròfags; l'any 2001, Haruta i col·laboradors, mitjançant estudis *in vivo* en ratolins transgènics que sobre expressaven mAIM van demostrar que la proteïna contribueix en la supervivència del macròfag contra els efectes apoptòtics durant la inflamació generada en un model d'hepatitis fulminant [239]. En aquest mateix treball es demostrà que aquesta molècula promou l'activitat fagocítica del macròfag [239]. mAIM també juga un paper important en el metabolisme lipídic. Estudis realitzats per Kurokawa i col·laboradors van observar com l'expressió de mAIM era major en el teixit adipós i en el sèrum de ratolins obesos respecte a ratolins control. S'observà com mAIM és incorporada en els adipòcits i macròfags mitjançant endocitosis a través del receptor Scavenger CD36 i un cop dins el citoplasma s'associa amb l'enzim Fatty Acid Synthase (FAS), inhibint la seva funció i estimulant la lipòlisi, la qual cosa resulta en una disminució de la mida dels adipòcits. [240]. Segons aquests resultats es suggereix que CD36 és receptor cel·lular per mAIM.

A més, estudis realitzats per Arai i col·laboradors han demostrat la presència de mAIM en plaques ateroscleròtiques murines i la implicació de mAIM en l'aterosclerosi degut a les seves propietats antiapoptòtiques [235]. Mitjançant models murins d'aterosclerosi LDLr $-/-$ es va observar que les lesions ateroscleròtiques eren menors en els ratolins deficientes en mAIM que en els ratolins que expressaven mAIM. L'augment en l'expressió de mAIM en el macròfag escumós promou la supervivència del macròfag escumós enfront l'apoptosi induïda pels efectes citotòxics de l'OxLDL, augmentant el procés inflamatori i el reclutament de noves cèl·lules, provocant l'augment de la placa d'ateroma [235]. Així doncs, aquest estudi va suggerir que mAIM és un factor aterogènic (**Figura 13**).

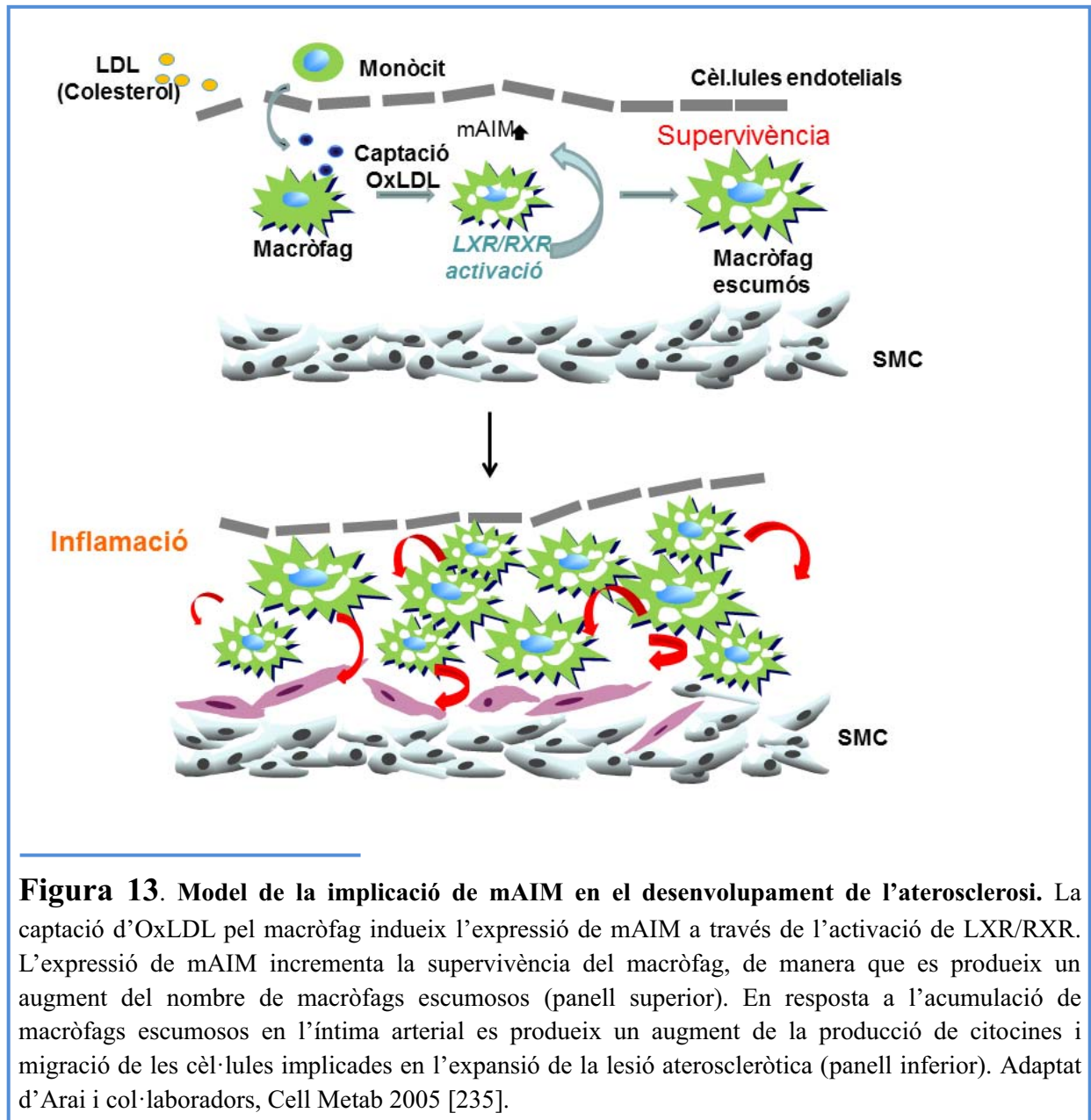
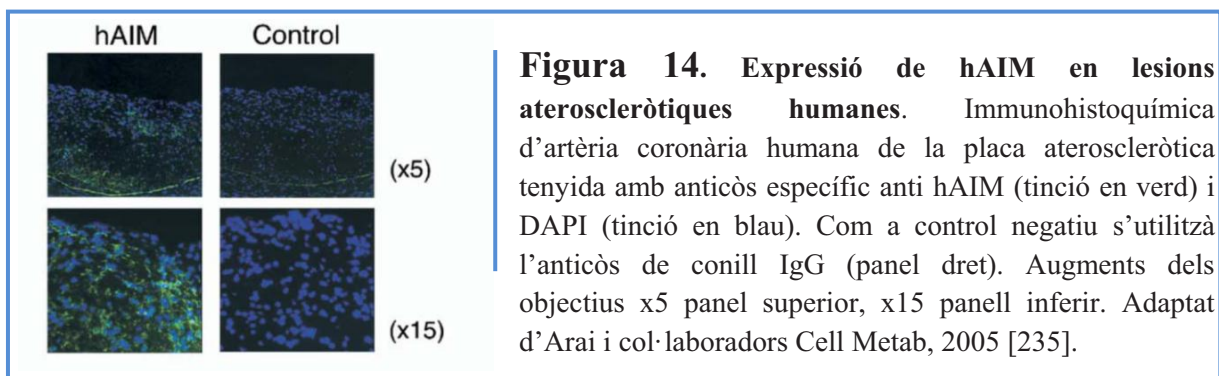


Figura 13. Model de la implicació de mAIM en el desenvolupament de l'aterosclerosi. La captació d'OxLDL pel macròfag indueix l'expressió de mAIM a través de l'activació de LXR/RXR. L'expressió de mAIM incrementa la supervivència del macròfag, de manera que es produeix un augment del nombre de macròfags escumosos (panell superior). En resposta a l'acumulació de macròfags escumosos en l'íntima arterial es produeix un augment de la producció de citocines i migració de les cèl·lules implicades en l'expansió de la lesió ateroscleròtica (panell inferior). Adaptat d'Arai i col·laboradors, *Cell Metab* 2005 [235].

La forma humana d'AIM (hAIM) ha estat menys estudiada; hAIM es troba circulant en sèrum en quantitats elevades (de l'ordre de $\mu\text{g/ml}$) i s'ha trobat associada a altres proteïnes del sèrum com les immunoglobulines M (IgM) però no a les fraccions d'immunoglobulines IgG o IgA del sèrum [241]. Aquest fet indica que hAIM podria jugar un paper important en l'homeòstasi de les IgM. Gràcies a la seva facilitat per ser detectada en el sèrum, estudis recents la descriuen com un possible marcador de sèrum de condicions amb elevat grau d'inflamació, com la cirrosi hepàtica [242, 243], dermatitis atòpica [244] i malaltia de Kawasaki [245]. A més a més, estudis utilitzant una forma quimèrica de la proteïna hAIM-mIg han suggerit que hAIM és capaç d'unir-se a diferents cèl·lules del sistema immunitari,

com monòcits i limfòcits [231] i d'aquesta manera podria jugar un paper important en la regulació del sistema immunitari. Estudis bioquímics mitjançant la forma recombinant de hAIM han suggerit que actua com a Pattern Recognition Receptor (PRR), essent capaç d'unir-se a la superfície de bacteries gram negatives i gram positives i a més a més, participa en la resposta inflamatòria del monòcits en resposta a patrons moleculars conservats de patògens com el lipopolisacàrid (LPS) i l'àcid lipoteicoic (LTA), inhibint la producció de $TNF\alpha$ en monòcits de sang perifèrica [246]. Recentment, mitjançant estudis immunohistoquímics, s'ha demostrat la presència de hAIM en macròfags alveolars (AM) del pulmó durant la malaltia d'obstrucció crònica de pulmó (COPD, de l'anglès Chronic obstructive pulmonary disease) [247]. Respecte a l'aterosclerosi, tan sols s'ha demostrat la seva presència en plaques ateroscleròtiques humanes [235] (**Figura 14**).



Així doncs, tot i les diferències de la proteïna AIM en les dues espècies (humana i murina), els diferents treballs suggereixen que AIM participa en mecanismes rellevants de la immunitat innata, i s'ha associat a diverses patologies. Entre aquestes patologies es destaca l'aterosclerosi on s'ha demostrat la presència de la proteïna en les plaques ateroscleròtiques humanes i murines però tan sols la forma murina ha estat directament involucrada funcionalment en els mecanismes moleculars de l'aterosclerosi.

4. MODELS MURINS D'ATEROSCLEROSI.

Existeixen nombrosos models experimentals d'aterosclerosi que utilitzen animals als que se'ls indueix la patologia de l'aterosclerosi mitjançant l'ingesta d'una dieta alterada, especialment en lípids [248, 249]. Entre ells el mono, el porc, el conill, el pollastre i el ratolí [250-252]. Però la majoria d'estudis de l'aterosclerosi han estat realitzats en la soca de ratolins C57BL/6, la qual és susceptible de formar lesions ateroscleròtiques quan els ratolins són alimentats amb una dieta rica en greixos i colesterol [253]. La soca C57BL/6 desenvolupa lesions ateroscleròtiques en l'espai subendotelial, prop de les vàlvules aòrtiques, i és per aquest motiu la principal soca elegida per ser genèticament manipulada amb la fi de desenvolupar models d'aterosclerosi. Les modificacions genètiques més emprades han estat aquelles en l'anul·lació de l'expressió de LDLr i apoE.

Ratolins deficients en el receptor LDL (LDLr/-).

Els ratolins deficient en LDLr (LDLr/-) van ser descrit per primer cop el 1993 per Ishibashi i col·laboradors [254]. En resposta al pinso normal els ratolins de la soca C57BL/6 LDLr/- desenvolupen una hipercolesterolèmia moderada. D'altra banda, però, aquests animals són extremadament sensibles a la hipercolesterolèmia induïda per dieta. Així, en resposta a una dieta rica en greixos tipus "Western", els ratolins LDLr/- desenvolupen lesions ateroscleròtiques robustes en tot l'arbre aòrtic.

Ratolins deficients en apoE (apoE/-).

Els ratolins deficient en apoE (apoE/-) van ser descrits el 1992 i són capaços de desenvolupar una hipercolesterolèmia severa amb una dieta estàndard [255]. A més, els ratolins apoE/- desenvolupen lesions ateroscleròtiques en la regió proximal de l'aorta i plaques d'ateroma disperses a tot el llarg de l'arbre aòrtic en una distribució similar a l'aterosclerosi humana.

Ratolins doble deficients en apoE i LDLr (apoE/- ; LDLr -/-).

En l'última dècada s'ha desenvolupat un model de ratolí doble "knock out" per apoE i LDLr, el qual desenvolupa una hipercolesterolèmia més severa i una aterosclerosi major que el model deficient en apoE, en aquest cas també accelerat per una dieta rica en greixos [254].

Així doncs, els models murins d'aterosclerosi són de gran importància per l'estudi dels esdeveniments bioquímics i cel·lulars que condueixen a la iniciació, progressió i/o regressió de la placa d'ateroma. Gràcies a la seva utilització s'han resolt molts dels enigmes respecte l'aterosclerosi i són crucials per l'assaig de possibles teràpies gèniques. Tot i això, s'ha de tenir present les seves possibles limitacions per extrapolar els resultats obtinguts al desenvolupament de la patologia humana, com per exemple les lesions generades són molt petites i es troben només a nivell de les vàlvules aòrtiques, a l'inrevés del que passa en humans, i aquestes estries grasses no progressen cap a plaques d'ateroma. Per altra banda respecte a models murins deficientes en apoE, s'ha de tenir present que l'absència d'apoE es considera una condició realment extrema i de freqüència bastant rara en humans. A més a més, experiments en femelles deficientes en apoE desenvolupen lesions més agressives que en mascles, un efecte contrari del que succeeix en l'espècie humana [197].

També cal tenir en compte que la composició lipídica entre les dues espècies no és igual:

- Mentre que en el plasma humà els valors normals de colesterol total oscil·len entre 150 i 250 mg/dL i la major part d'aquest es troba associat a les LDL, en els ratolins de la majoria de les soques alimentades amb una dieta pobre en greixos, els valors de colesterol plasmàtic són inferiors a 100 mg/dL i la major part d'aquest es troba associat a la fracció d'HDL. En aquesta situació els ratolins no desenvolupen cap lesió o bé en desenvolupen d'insignificants [256].
- En la soca de ratolins C57BL/6, les HDL constitueixen una població mono dispersa d'una grandària aproximada de 9.9 nm, la qual cosa contrasta amb l'heterogeneïtat de les HDL humanes (6.8 a 10 nm) [256].
- Les apolipoproteïnes majoritàries de les HDL en ratolí, com en els humans, són l'apoA-I (60-80%) i l'apoA-II. Però en el cas de apoA-II del ratolí, l'absència d'una cisteïna en posició 6 impedeix la formació de ponts disulfur i la formació d'una estructura dimèrica. Per aquest motiu, el pes molecular de l'apoA-II del ratolí té uns 8 kDa mentre que en humans la major part de l'apoAII es troba en forma d'un dímer de 16 kDa [257].

5. MODELS CEL·LULARS HUMANS D'ATEROSCLEROSI.

La utilització de cultius cel·lulars com a models de l'aterosclerosi esdevé una eina de gran utilitat per avaluar moltes de les alteracions que es produeixen durant el desenvolupament de la placa d'ateroma a nivell cel·lular i molecular en humans. Entre els tipus cel·lulars es destaca la utilització dels cultius primaris de macròfags humans diferenciats de monòcits de sang perifèrica (HMDM) els quals en presència de les formes mLDL són capaços d'acumular lípids i diferenciar-se a macròfags escumosos [258], o bé la línia immortalitzada promonocítica la qual procedeix d'un pacient amb leucèmia monocítica aguda, anomenada THP1 [259].

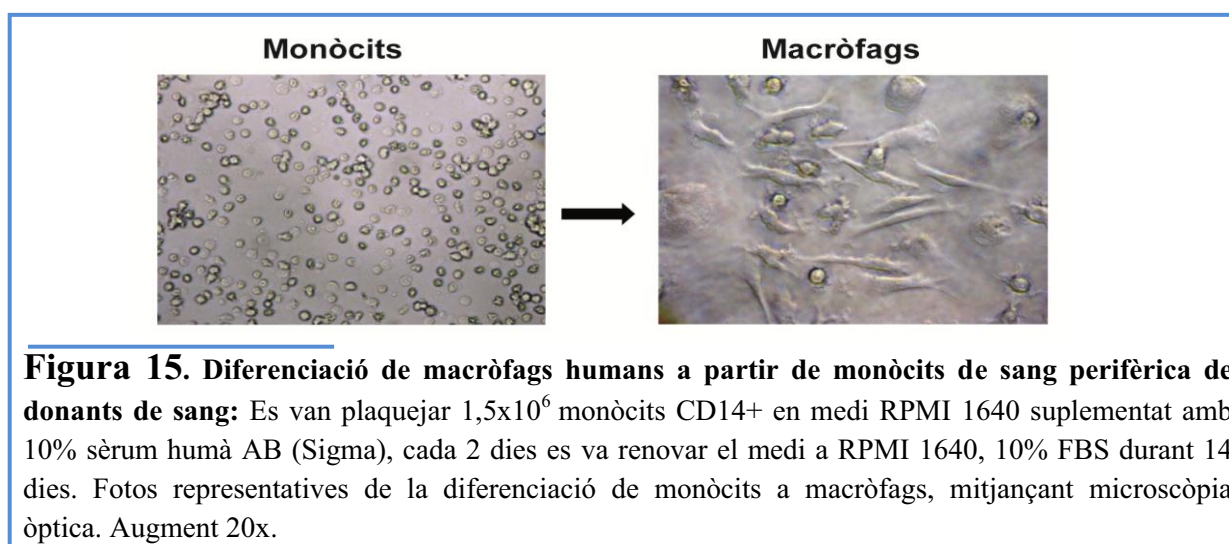
La línia cel·lular THP1 expressa marcadors característics dels monòcits [260]. És una línia cel·lular caracteritzada per la seva capacitat fagocítica i per la producció de lisozims i esterases. Quan les cèl·lules THP1 són tractades amb 13-acetat 12-miristat de forbol (PMA) canvien el fenotip, esdevenint cèl·lules més madures, exhibint característiques morfològiques similars als macròfags [261], així com l'augment en els nivells d'adhesió, augmentant la capacitat de fagocitosi o bé augmentant l'expressió de CD11b i CD14 en la membrana cel·lular [262]. A més a més, les cèl·lules THP1 diferenciades tenen la capacitat d'acumular lípids en el seu interior, ja que durant el tractament de les cèl·lules THP1 amb PMA es disminueix l'expressió del LDLr i augmenta l'expressió dels receptors implicats en la captació lipídica, els Receptors Scavengers [263]. Per aquest motiu les cèl·lules THP1 activades amb PMA han estat àmpliament utilitzades per l'estudi *in vitro* de la formació de les cèl·lules escumoses durant l'aterosclerosi [264].

MATERIAL I MÈTODES

6. Cultius de macròfags.

6.1. Macròfags humans derivats de monòcits de sang perifèrica.

Es va seleccionar sang de donants sans provinents del departament de Bang de Sang i teixits (BST) seguint el procediment institucional estàndard per donació i procés de sang. Els monòcits provinents de sang perifèrica (PBMCs) van ser aïllats per densitat de gradient centrifugant 400xg durant 25minuts, les cèl·lules limfocitàries positives per CD3 (CD3+) van ser eliminades pel kit Comercial “RosetteSep human CD3 depletion cocktail” (StemCell Technologies, Seattle, WA). Les cèl·lules recollides van ser rentades dues vegades amb PBS i contades utilitzant el kit comercial “Perfect-Count microspheres” (Cytognos, Salamanca, Espanya) seguint les instruccions del fabricant. Seguidament els monòcits es van obtenir per selecció positiva utilitzant MicroBeads CD14 i autoMACS columns (Miltenyi Biotec) [265]. La posterior diferenciació de monòcits a macròfags, HMDM, es va produir per adhesió espontània de les cèl·lules a les plaques de 24 pous durant 14 dies en medi RPMI 1640 suplementat amb 10% de sèrum humà AB (Sigma) (**Figura 15**).



Per avaluar l'efecte de hAIM en les cèl·lules HMDM, aquestes van ser incubades amb la proteïna recombinat d'AIM, rhAIM (R&D Systems (Abingdon, U.K.) $1 \mu\text{g/ml}$ lliure

d'endotoxines (<1.0 EU per 1 µg de proteïna pel mètode de LAL) o bé com a control 1µg/ml d'Albúmina purificada de plasma humà (Grífols, Barcelona, Spain) durant 24 hores.

6.2. Generació de la línia cel·lular THP1-hAIM

L'expressió de hAIM en cultius cel·lulars desapareix [238], és per aquest motiu que es va transfectar hAIM establement en la línia cel·lular de leucèmia monocítica cel·lular d'origen humà THP1. Per generar la línia cel·lular THP1 transfectada establement amb hAIM es va clonar la seqüència completa de hAIM en un vector d'expressió en cèl·lules eucariotes i posterior inserció del vector de forma estable en la línia cel·lular THP1.

Obtenció i clonatge de cDNA de hAIM

Es va utilitzar RNA humà (Clontech) de medul·la òssia, on l'expressió d'AIM és elevada [231] i a partir d'aquest RNA es va produir la transcripció inversa a cDNA. El cDNA de hAIM es va amplificar per PCR amb els següents encebadors específics:

5' CGCCGCTAGCGATGGCTCTGCTATTCTCCTT 3' (sentit),

5' GCGCGGATCCCTATCCTGAGCAGATGACAG 3' (antisentit).

Els encebadors específics van ser dissenyats per incorporar seqüències diana d'enzims de restricció: en l'encebador sentit es va incorporar un lloc de restricció per a NheI GCTAGC i en l'encebador antisentit un codó stop seguit d'una diana de restricció per l'enzim BamHI GGATCC. El producte de PCR, es va clonar en el vector pGEMt (Promega) per sistema de TA cloning, es va seqüenciar per garantir la correcta inserció en el plàsmid, i assegurar que no s'havia incorporat cap mutació. Posteriorment, després de ser digerit per NheI/NotI, es va clonar el producte de PCR en el vector d'expressió en cèl·lules eucariotes pCI-neo (Promega, cedit per la Dra. Margarita Martín, UB.) (Figura 16).

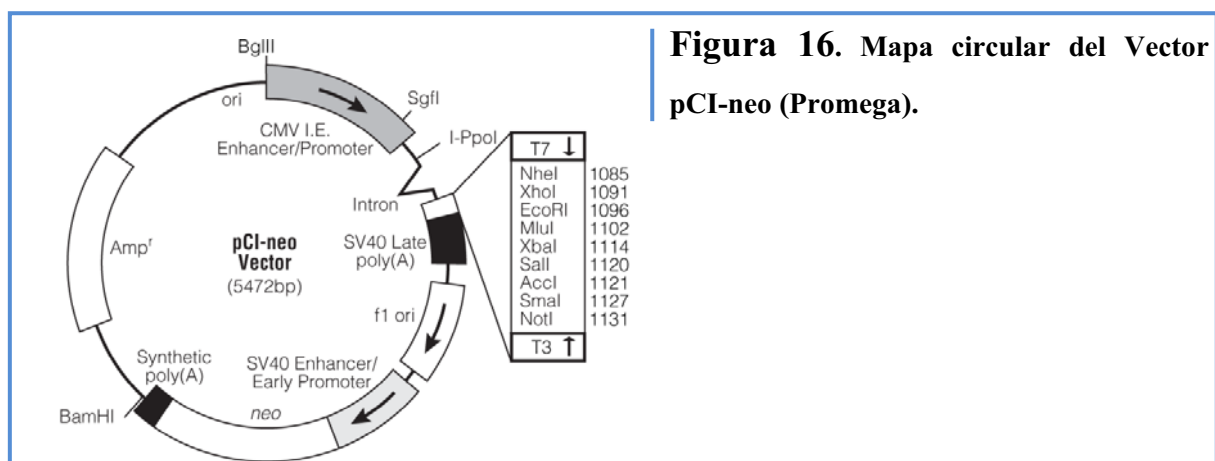


Figura 16. Mapa circular del Vector pCI-neo (Promega).

Transfecció estable de la seqüència de hAIM en la línia cel·lular THP1.

El vector pCI-neo (Promega) va ser digerit per l'enzim de restricció XmnI (Promega): El vector es va introduir en la cèl·lula mitjançant electroporació. Es va utilitzar el kit comercial d'AMAXA i l'aparell de transfecció: *Nucleofector™ 2b Device* utilitzant el programa U-001(U-01). Les cèl·lules THP1 establement transfectades amb hAIM (anomenades THP1-hAIM) o el vector sol (anomenades THP1-Vector) van ser seleccionades amb l'antibiòtic de resistència Geneticina (G418, Invitrogen) durant 15 dies a una concentració de 500 µg/ml. La producció de hAIM es va analitzar en llisats cel·lulars i sobrenedant de la següent manera:

A **nivell cel·lular**, les cèl·lules després de ser rentades amb PBS (150 mM NaCl, 8 mM, Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4) i es van llisar amb el tampó: [20 mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton-X100 1 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich), inhibidor de proteases (Roche) i 1mM PMSF] durant 30 minuts a 4°C. Tot seguit el llisat cel·lular va ser immunoprecipitat a 4°C durant tota la nit amb 1 µg de l'anticòs anti hAIM mAb 18.2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) i 20µl de boles de Safarosa (50%) unides a proteïna G (Sigma-Aldrich).

Per l'anàlisi de la **proteïna hAIM secretada** 1ml del cultiu de sobrenedant lliure de fetal va ser precipitat amb 14% Àcid Tricloroacètic (TCA) i 0.14% Triton-X durant 30 minuts a 4°C. Es va obtenir el precipitat de proteïnes centrifugant a 12000 rpm durant 30 minuts a 4°C, i es van realitzar els rentats amb acetona a 4°C.

Per realitzar la majoria d'experiments següents, si no s'especifica el contrari, les cèl·lules THP1 expressant hAIM o amb vector buit van ser diferenciades amb 13-acetat 12-miristat de forbol (PMA, Sigma), a una concentració de 10 ng/ml durant 48 hores, a una densitat cel·lular de 1.5×10^6 cèl·lules per pou, en plaques de cultiu de 6 pous.

7. SDS i Western blot.

Es va analitzar l'expressió de la proteïna hAIM o mAIM mitjançant un gel de SDS-poliacrilamida. Posteriorment, les proteïnes es van electrotransferir a una membrana de nitrocel·lulosa (Bio-Rad Laboratories, UK), i es bloquejà amb el tampó de bloqueig Starting Block TBS (Pierce). A continuació les membranes van ser incubades durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs específic anti **hAIM** (anticòs hAIM biotinat: Goat antihuman CD5L Biotinylated affinity purified RyD (Vitro) o bé **mAIM** (anticòs mAIM biotinat: Goat antimouse CD5L Biotinylated affinity purified RyD (Vitro) o bé **β -tubulina** (Sigma) diluït 1/1000 amb tampó de bloqueig. L'anticòs secundari marcat amb fluorescència (IRDye680Cw-conjugat amb estreptavidina o bé IRDye 800Cw-conjugat goat anti mouse IgG, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) es va afegir durant 60 minuts a temperatura ambient. La unió de l'anticòs a la proteïna AIM es va detectar mitjançant el sistema d'imatge Odyssey Infrared Imager (Li-Cor). Entre els diferents passos es van realitzar 3 rentats amb TBS-0.01% Tween 20 durant 15 minuts per evitar possibles unions inespecífiques.

8. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant PCR a temps real.

L'estudi de l'expressió dels nivells de mRNA que codifiquen pels gens d'interès es va dur a terme per la tècnica de retrotranscripció de l'RNA i la posterior amplificació selectiva mitjançant PCR a temps real. Per l'extracció de RNA es va utilitzar les columnes comercial High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Es va determinar la concentració i puresa de l'RNA amb l'espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000, UV-Vis 220 - 750 nm (Thermo Scientific). A partir de 1µg de RNA Total es va produir la transcripció inversa a cDNA utilitzant l'assaig comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), emprant com a encebador oligonucleòtids de Timidina (Oligo dT). L'anàlisi quantitatiu de mRNA dels gens es va fer mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR) amb l'aparell LightCycler® 480 PCR ,utilitzant el fluorocrom SyberGreen: KAPA SYBR Fast Master Mix (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA).

L'amplificació es va dur a terme segons els següents cicles de temperatura; desnaturalització inicial de 95°C durant 5minuts, 35 cicles de 95 °C durant 10 segons, 60 °C durant 20 segons i 72 °C durant 10 segons. Els encebadors específics utilitzats per cada gen són els següents:

hAIM;5'-GACGAGAAGCAACCCTTCAG-3' i 5'-TCAAAGGGATCTTCACATTCGA -3'

CD36;5'-GAGAACTGTTATGGGGCTAT-3' i 5'-TTCAACTGGAGAGGCAAAGG -3'

SR-B1;5'-TCAGCTCCCAAGGGCTCTGTGC-3' i 5'-AAAGGCGCTTTGCCTGGCCT -3'

ABCA1;5'-TGAGCTACCCACCCTATGAACA-3' i 5'-CCCCTGAACCCAAGGAAGTG-3'

ABCG1;5'-CCTGCTGTACTTGGGGATCGGGAACG-3' i 5'-CCAGCGCGGCAAACAGCACAAAG-3'

Ciclofilina A;5'-CTCCTTTGAGCTGTTTGCAG-3' i 5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3'

Els valors d'expressió gènica van ser normalitzats en relació als nivells de l'expressió del gen expressat constitutivament en la línia cel·lular, Ciclofilina A. L'increment dels nivells d'expressió van ser calculats utilitzant com a referència els nivells d'expressió de cada gen en les cèl·lules control sense tractament.

9. Aïllament de HDL, LDL i modificació de LDL.

El mètode emprat per separar les diferents lipoproteïnes presents en el plasma es basa en la seva diferent densitat: quilomicrons (densitat < 0,96 g/mL), VLDL (0,96 - 1,006 g/mL), IDL (densitat 1,006 – 1,019 g/mL), LDL (densitat 1,019 – 1,063 g/mL), HDL2 (densitat 1,063 – 1,125 g/mL) i HDL3 (densitat 1,125 – 1,210 g/mL) [266]. En el nostre cas vam seleccionar el rang de densitat 1,019 – 1,063 g/mL per aïllar-ne les LDL. Per aïllar-les hem de tenir present que la densitat del plasma és de 1,006 g/mL i per fer-ho es dissol una quantitat de BrK per ajustar la densitat final a 1,019 g/mL que es calcula segons la següent fórmula [Radding i Steinberg]:

$$\text{KBr (mg)} = \frac{[\text{Vol. X (densitat final -densitat inicial)}]}{[1-(0,312 \times \text{densitat final})]}$$

Breument, el KBr es dissol lentament per prevenir l'agregació. El volum es distribueix en els tubs d'ultracentrifugació i la solució de densitat 1,019 g/mL se superposa lentament fins a un volum final de 20 mL. Seguidament els tubs equilibrats són centrifugats a 36.000 rpm (100.000 g) a 4 °C durant 18 h. El sobrenedant (VLDL + IDL) es descarta i la

fracció restant (que conté les LDL, HDL2 i HDL3 a banda de la fracció de plasma lliure de lipoproteïnes) se separa seqüencialment (36.000 rpm a 4 °C durant 18 h) tot tenint en compte les densitats de cadascuna de les lipoproteïnes d'interès per a l'estudi.

Els plasma emprats per aïllar-ne les lipoproteïnes va consistir en una mescla de plasma d'individus normolipèmics.

Com a criteri d'acceptabilitat es va considerar com a condició de plasma normolipèmic quan els valors de colesterol i de triglicèrids no van excedir les xifres de colesterol <5 mM i triglicèrids <1,3 mM, respectivament.

La composició de les lipoproteïnes aïllades a partir del pool de plasmes normolipèmics es va determinar mitjançant la utilització de kits comercials adaptats a un robot autoanalitzador Cobas 6000/c501. Els reactius que es van utilitzar per a la determinació del colesterol total i de l'apoB i l'apoA-I van ser adquirits a través de Roche Diagnostics.

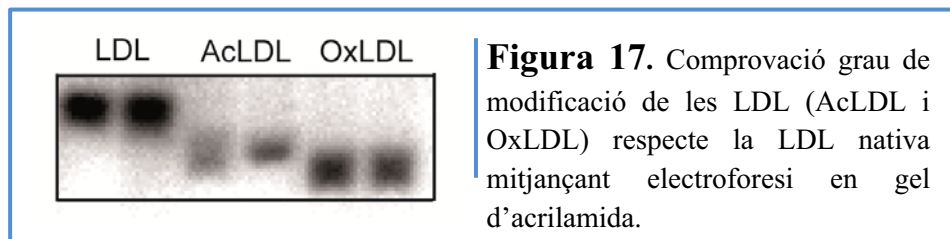
9.1. Modificació de LDL per Oxidació (OxLDL).

El procés oxidatiu es va realitzar seguint el protocol prèviament descrit [267]. Breument, després d'aïllar les lipoproteïnes, van ser dialitzades en sacs de cel·lulosa amb PBS durant tota la nit. La solució es va ajustar a una concentració final de 0,2 g/L de proteïna per tal d'evitar la formació d'agregats. La modificació oxidativa es va efectuar a través de l'addició de Cu_2SO_4 (5 μM) i de deixar que les LDLs s'oxidessin a temperatura ambient durant almenys 24 h. La LDL oxidada es va concentrar per ultracentrifugació, tot considerant que la solució es troba a una densitat de 1,006 g/mL, tot ajustant la solució a una densitat de 1,100 g/mL (la LDL oxidada té una major densitat que la LDL nativa). Seguidament, el procés d'oxidació es va aturar mitjançant l'addició de 20 μM d'hidroxitoluè butilat (BHT). El BHT és un captador de radicals lliures. Seguidament, les OxLDL es van dialitzar en tampó A (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,4) que conté l'EDTA (quelant d'ions bivalents) durant 48 h per prevenir el progrés del procés oxidatiu. Les OxLDL dialitzades es van mantenir a 4 °C fins al moment de ser utilitzades en els experiments d'incubació amb les cèl·lules.

9.2. Modificació de LDL per Acetilació (AcLDL).

El procés d'acetilació de les LDL es va realitzar seguint el protocol de Basu i col·laboradors [268]. Breument; es va dialitzar les LDL amb tampó A (10mM Tris, 1mM EDTA a pH 7.4) a una concentració superior a 1 g/L. A continuació es va barrejar l'LDL a una

relació 1:1 (v:v) amb solució d'acetat sòdic saturat i es deixà en agitació constant a 4°C. Seguidament, s'afegeixen 2 µL d'anhídrid acètic i es deixa en agitació suau a 4°C durant 15 minuts, repetint-se aquest procés tres vegades més. En total s'addicionen 4 vegades l'anhídrid acètic en intervals d'un quart d'hora cadascun. Finalment, la mostra es va filtrar i es dialitzar amb el tampó A per tal d'eliminar l'excés de sal i l'anhídrid acètic. El grau d'oxidació i acetilació de les LDL es va comprovar per mitjà de la determinació de la seva mobilitat electroforètica tot utilitzant gel d'agarosa MIDIGEL tot comparant-la amb la que presenten les LDLs natives. **Figura 17.**



Les LDL van ser dialitzades utilitzant les columnes PD-10 (Ge Healthcare) amb medi de cultiu lliure de FBS i filtrades amb filtres de 0.22µM (Millipore).

10. Determinació dels nivells d'AIM en sèrum.

10.1. Models murins Ateroscleròtics apoE^{-/-} i LDLr^{-/-}.

Com a animals experimentals es van utilitzar ratolins de la soca C57BL/6J control, i ratolins transgènics deficients en l'expressió del receptor LDL: LDLr (Strain Name: AKR.129S7(B6)-^{Ldlrtm1Her/J}) i deficients en l'expressió de apoE: apoE ^{-/-} (Strain Name: B6.129P2-apoE^{tm1Unc/J}) (The Jackson Laboratory; Sacramento, USA). Tots els procediments de manipulació dels animals experimentals van ser aprovats pel *Dept. d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural* del Govern de Catalunya, d'acord amb la legislació de la Comunitat Europea en relació a la protecció d'animals experimentals (Llei 1997 del Govern de Catalunya; *Real Decret Espanyol* 1201/2005; i Europeu 86/609/CEE; 91/628/CEE; 92/65/CEE i 90/425/CEE).

Els animals es van mantenir en tot moment sota condicions controlades de temperatura (22°C) i d'humiditat (entre el 80% i el 90%). Els cicles d'il·luminació de llum/fosc duraven 12 hores i començaven a les 7 del matí. Els ratolins deficients en apoE van ser alimentats amb pinso de manteniment durant 14 setmanes, fins el moment del sacrifici. L'accés a l'aigua també va ser lliure. Pel que fa als ratolins LDLr ^{-/-} van ser alimentats durant dues setmanes amb la dieta rica en greixos i colesterol, tipus Western, que consistia en pinso que contenia 1.25% colesterol, 7.5% greix i 0.5% colat sòdic (ICN Pharmaceutical Inc.; Cat.960404) [269]. Els ratolins van ser pesats al llarg del període en una o altra dieta i també just abans de ser sacrificats. Abans del sacrifici, la sang es va obtenir en tubs amb EDTA o heparina com a anticoagulants, en funció del tipus d'estudi, i va ser centrifugada a 12000xg durant 10 minuts a 4°C per separar-ne el plasma. El plasma es va guardar a -80°C.

1 µl de sèrum murí es desnaturalitzà en condicions no reductores i es va resoldre la presència de la proteïna mAIM en un gel d'Acrilamida SDS al 10% i posterior anàlisi mitjançant Western Blot, com s'ha indicat anteriorment.

10.2. Pacients amb Arteriopatia Perifèrica (PAD).

Gràcies a la col·laboració del Biobanc de la Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol i amb col·laboració amb Unitat de Suport a la Recerca Metropolitana Nord, IDIAP J Gol, es van seleccionar 51 mostres de sèrum de pacients procedents de l'estudi ARTPER, el qual és un estudi multicèntric de més de 3000 individus majors de 50 anys de 28 centres d'atenció primària realitzat al Barcelonès, Nord-Maresme i Barcelona Ciutat [21]. Les característiques dels pacients són resumides en la **Taula 4**. PAD va ser avaluat utilitzant l'índex ITB prèviament descrit [21, 270], dividint la pressió sanguínia sistòlica del turmell per la pressió sanguínia sistòlica del braç. Els valors de l'índex ITB < 0.9 van ser considerats com a PAD. L'estudi va ser aprovat pel comitè ètic; Institut d'Investigació i recerca en Atenció Primària (IDIAP) Jordi Gol i Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IGTP). Es va obtenir el consentiment informat i es seguí les recomanacions de la Declaració de Hèlsinki.

Característiques dels individus inclosos en estudi	
	n
Gènere	
Mascle	20
Femella	31
Edat	
≤65	14
65-75	16
>75	21
Obesitat ¹	
Per sota pes/normal, IMC <25	14
Pes normal, 25≤IMC<30	24
Obés, IMC >30	13
Dislipidemia ²	
No	16
Yes	35
Tractament Hipolipemiant ³	
No	25
Si	26
PAD ⁴	
No	35
Si	16
Total	51

Taula 4: Característiques dels pacients analitzats. 1) IMC: Índex de massa corporal expressat en Kg/m² 2) Historial clínic de hipercolesterolèmia (nivells de colesterol total > 250 mg/dl (6,5 mmol/l). Nivells determinats en dos test consecutius, en intervals de 1-8 setmanes. En el segon anàlisi es determinen nivells de HDL, LDL i triglicèrids. 3) Tractament amb estatines. 4) Definit per l'Índex Turmell-Braç; ITB < 0.9.

Detecció de hAIM en el sèrum del pacients diagnosticats amb PAD:

S'immobilitzà 100ng de l'anticòs monoclonal específic per hAIM, 1C8 monoclonal antibody (Abnova, Taiwan) diluït en tampó carbonat (0.1M Carbonat Sòdic, pH9.5) a la placa de polistirè de 96 pous (Nunc), a una concentració de 5 µg/ml, durant tota la nit a 4°C. Al dia següent la placa es bloquejà amb PBS al 3% en BSA, durant 1 hora a 22°C. Tot seguit es va procedir a afegir 50µl de les mostres de sèrum diluïdes en PBS 3% en BSA o bé s'afegí la forma recombinant de hAIM (rhAIM) produïda en la línia cel·lular CHO (Evitria SA Bremen, Alemanya) i purificada al laboratori (dades no mostrades). Es va generar la corba estàndard mitjançant dilucions seriades de rhAIM des de 1.5ng fins 0 ng.

Es va deixar incubar a 22°C durant 2 hores i la presència de hAIM es va detectar amb 100 ng de l'anticòs policlonal marcat amb biotina (R& D Systems, MN, USA), durant 1 hora en agitació suau a 22°C. A continuació s'afegí l'estreptavidina conjugada amb peroxidasa i es va deixar reaccionar durant 30 minuts a 22°C. Finalment s'afegí el substrat 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacció enzimàtica s'aturà amb la solució d'àcid sulfúric i la formació de producte es va llegir a 450 nm en el lector d'absorbància Varioskan (Thermofisher). Per eliminar proteïnes no unides, anticossos, o bé estreptavidina entre cada pas es va rentar la placa amb 0,1 % PBS-Tween-20. Paral·lelament s'utilitzà el kit comercial CircuLex Human AIM/CD5L/hAIM ELISA (MBL International) seguint les instruccions dels fabricant.

Test estadístic: Degut a la distribució no simètrica de la concentració de hAIM es va calcular la mitjana (P50) com a estimador de tendència central i el rang Inter quartil (RIQ) com a mesura de dispersió. Les mitjanes entre grups es van comparar utilitzant els tests no paramètrics de Mann-Whitney (2 grups) i de Wilcoxon (més de dos grups). Degut a la distribució de les dades, es va transformar la variable dependent, concentració de hAIM, aplicant el logaritme en base 2, i d'aquesta manera millorar l'ajust de model de regressió lineal utilitzat per l'associació independent de la variable PAD com la concentració de hAIM. Els coeficients per la variable PAD són interpretats com el canvi en el logaritme quan les variables independents són diferents de 1. La interpretació és anàloga a l'Interval de Confiança de 95%. Amb aquest model de regressió múltiple lineal es va observar l'efecte de la variable PAD ajustada a les altres variables incloses en el model. Per l'anàlisi de les dades es va utilitzar el paquet estadístic Stata 12.1 (College Station, Texas 77845 USA).

Paral·lelament es va corroborar els resultats dels nivells de hAIM obtinguts per ELISA de 4 pacients sans i 3 pacients amb PAD mitjançant Western Blot. 1 µl de sèrum humà es desnaturalitzà en condicions reductores i es va resoldre la presència de la proteïna en un gel d'Acrilamida SDS al 8% i posterior Western Blot.

11. Anàlisi *in vitro* de l'expressió de hAIM en macròfags escumosos.

Es van plaquejar $1,5 \times 10^6$ monòcits de sang perifèrica de donants humans sans i es van diferenciar a macròfag durant 48 hores amb medi RPMI suplementat amb 1% FBS i 20ng/ml de M-CSF o GM-CSF (Peprotech). Després de 48 hores es procedí a realitzar els diferents tractaments per unes altres 24 hores: medi RPMI 1% FBS suplementat amb 50 µg/ml OxLDL o bé amb 1 µM de cada un dels lligands sintètics T0901317 (T1317, Tocris Bioscience) i 9cis-Retinoic Acid (9cRA, Sigma) o bé DMSO com a control negatiu (Sigma). Per una part es va fer l'aïllament de RNA total i es va realitzar la quantificació de mRNA per hAIM mitjançant PCR a temps real, com hem descrit anteriorment. Per la detecció de la proteïna hAIM, es va determinar la concentració proteica en el llisat cel·lular mitjançant el kit BCA (Pierce Perbio Science, Rockford, IL, USA), seguint les instruccions del fabricant. Posteriorment 100-150 µg de llisat cel·lular o 1ml del cultiu de sobrenedant va ser precipitat amb 14% Àcid Tricloroacètic (TCA) i es va resoldre la presència de hAIM en el llisat cel·lular o en el sobrenedat mitjançant SDS-PAGE i Western Blot, com hem descrit anteriorment.

12. Assaig d'apoptosi cel·lular.

Les dues línies cel·lulars, THP1-Vector i THP1-hAIM es van plaquejar a una densitat de 10^5 cèl·lules per pous en placa de 24 pous (NUNC) en medi RPMI 10% FBS i PMA 10ng/ml durant 48 hores. Després de les 48 hores es van rentar els pous 3 cops amb PBS i es van afegir els següents estímuls per induir l'apoptosi: Cicloheximida (Sigma) a una concentració de 100 µg/ml durant 6 hores, i OxLDL a 5 i 100 µg/ml durant 24 hores. Al dia següent es van recollir les cèl·lules de les plaques gràcies a l'acció de l'Accutasa (PAA Laboratories, UK). Després de fer dos rentats en PBS fred es procedí a tenyir amb els anticossos Annexin V i 7-AAD conjugats amb peroxidasa seguint les instruccions del kit comercial (Apoptosis detection kit, Becton-Dickinson, Palo Alto, CA). Les cèl·lules van ser

analitzades en el citòmetre de flux FACSCantoII i els resultats analitzats en el programa d'anàlisi Cell Quest (Becton-Dickinson). L'apoptosi va ser expressada com a percentatge de cèl·lules positives per Annexina V utilitzant com a referència les cèl·lules THP1-Vector no tractades, indicat com a 1.

13. Quantificació de la formació de macròfags escumosos.

La quantificació de l'acumulació de contingut lipídic en el macròfags es va realitzar per mitjà de dos colorants lipídics; Oil Red O i Nile Red O, i el posterior anàlisi de la coloració mitjançant microscòpia òptica i citometria de flux, respectivament. Les cèl·lules THP1-Vector i THP1-hAIM es van plaquejar a una densitat de 1×10^5 cèl·lules per pou en placa de 6 pous en els assaigs de Oil Red O o bé $2,5 \times 10^5$ cèl·lules per pou, en placa de 24 pous, en els de Nile Red O, en medi RPMI 10% FBS, PMA 10ng/ml durant 48 hores. A continuació es va retirar el medi, rentar les cèl·lules tres vegades amb PBS i es va afegir OxLDL i AcLDL a una concentració de 150 $\mu\text{g/ml}$ en medi RPMI, 1% FBS, es deixà incubar 24h a 37°C, després d'aquest temps es procedí a tenyir els components lipídics mitjançant Oil Red O o bé per Nile Red O.

Per la tinció amb Oil Red O, es va retirar el medi de la placa i després de 3 rentats en PBS es va afegir 10% de formalina en el pous per fixar les cèl·lules adherides, es va deixar incubar 1 hora a temperatura ambient. Un cop les cèl·lules van ser fixades es van netejar amb isopropanol al 60%, es van deixar assecar i es van tenyir amb la solució de colorant Oil Red O durant 10 minuts. Després de 4 rentats amb aigua s'observà la tinció del colorant en els cossos lipídics mitjançant microscopi òptic.

Per la tinció amb Nile Red O, després de recollir les cèl·lules i centrifugar-les 5 minuts a 1500 rpm, amb PBS, es va fixar el pellet cel·lular amb 200 μl de formalina 10% i es va deixar incubar 5 minuts a temperatura ambient. Posteriorment es va centrifugar i descartar el medi, de manera que es va resuspendre les cèl·lules amb 1mM de la solució de Nile Red O (Molecular Probes, Life Technologies, NY, USA), diluït amb PBS, i es deixà tenyir 10 minuts a temperatura ambient, protegint de la llum. La incorporació de Nile Red O en les cèl·lules va ser analitzada mitjançant citometria de flux, adquirint 10000 esdeveniments per mostra.

14. Quantificació de colesterol total i èsters de colesterol.

Es van diferenciar HMDM i 24 hores abans de l'experiment es va canviar el medi per RPMI 1% FBS suplementat amb 1µg/ml rhAIM o Albúmina humana. Després de 24 hores es van realitzar rentats successius amb PBS i s'afegí 150µg/ml de LDL nativa, AcLDL o bé OxLDL en medi RPMI suplementat amb FBS 1% i colesterol marcat amb 4µCi/ml [³H], per unes altres 24 hores. Per tal de realitzar l'extracció lipídica intracel·lular es van tractar les cèl·lules amb 200µl de Tripsina (2.5x) durant 30 minuts, es va aturar la reacció de la Tripsina amb 900µl de RPMI al 10% fetal i es centrifugà a 1000 rpm, durant 5 minuts. A continuació s'eliminà el sobrenedant i s'afegí 100µl de NaOH 0.2N durant tota la nit. D'aquests 100µl es va determinar la concentració de proteïna utilitzant el kit d'assaigs de BCA (Pierce). De la resta (75µl) es va realitzar l'extracció lipídica afegint 1ml de hexà-isopropanol en proporció 3:2 (v/v) durant 30 minuts. Es va separar la fracció lipídica de la proteïna cel·lular mitjançant centrifugació a 2000 rpm durant 15 minuts. 800µl del sobrenedant es van traspasar a tubs cònics i es van evaporar amb nitrogen, d'aquesta manera es va obtenir l'extracte lipídic per posteriorment separar la seva composició lipídica en cromatografia en capa fina.

L'extracte lipídic obtingut es va resuspendre amb 100 µl de cloroform el qual conté els estàndards del colesterol èsters, com a marcador de bandes. S'aplicà 15µl de l'extracte lipídic a la placa cromatogràfica de sílica gel (Whatman). Les plaques es van introduir en cubetes cromatogràfiques amb la solució orgànica heptà:dietilèter:àcid acètic glacial 74:21:4. Després de separar les bandes lipídiques per TLC, van ser visualitzades per vapor I₂. Es va procedir a quantificar la proporció de colesterol marcat [³H] de les bandes en l'aparell de centelleig 1500 TRICARB beta counter (Perkin Elmer).

15. Assaig d'eflux de colesterol.

Es va afegir 150µg/ml d'AcLDL en medi RPMI suplementat amb FBS 1% i colesterol marcat amb 4µCi/ml [³H] en amb macròfags diferenciats de monòcits (HMDM) i en les línies cel·lulars transfectades THP1-hAIM i THP1-Vector diferenciades durant 5 dies a 50ng/ml de PMA seguint el protocol de Kritharides i col·laboradors [271]. Després de 24 hores, el medi va ser substituït per RPMI 0.2% BSA lliure de àcids grassos per unes altres 24 hores. Tots seguit es va procedir a induir l'eflux de colesterol, afegint novament medi RPMI amb la presència dels diferents acceptors lipídics: 2% de plasma humà de donant sa normolipidèmic, (colesterol total<5.2mmol/L, triglicèrids<1mmol/L); 25µg/ml apoA-I (Sigma) com a acceptor lipídic específic de ABCA1, o bé 25µg/ml HDL2 com a acceptor lipídic específic de ABCG1, durant 4 hores. Després d'aquest temps es va recollir el medi i les cèl·lules es van solubilitzar en 0.5 M NaOH durant tota la nit a 4°C. 20µl de l'extracte cel·lular va ser utilitzat per determinar la quantitat proteica utilitzant el kit comercial BCA (Pearce). L'activitat radioactiva del colesterol marcat, en el medi i en la fracció cel·lular, es va dur a terme utilitzant el comptador de centelleig 1500 TRICARB beta counter (Perkin Elmer). El percentatge de colesterol efluxat de l'interior cel·lular cap al medi va ser calculat de la següent manera:

Percentatge de colesterol efluxat: $100 \times (\text{cpm}^* \text{ el medi}) / (\text{cpm}^* \text{ en el medi} + \text{cpm}^* \text{ en la fracció cel·lular})$. *cpm = *Comptes per minut*

16. Captació de DiI-OxLDL i DiI-AcLDL.

Per tal d'avaluar la capacitat de captació del macròfags per les mLDL s'utilitzà OxLDL o AcLDL marcades amb fluorescència DiI (perclorat de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) Intracel, Frederick, MD, USA. Les cèl·lules THP1 o bé HMDM van ser incubades durant diferents temps amb DiI-OxLDL o bé DiI-AcLDL a 37°C en medi RPMI 1640 suplementat amb 0.2% (v/v) de BSA lliure d'àcids grassos (Sigma). Per garantir que la unió fos específica es van realitzar assaigs de competència; 1 hora abans d'incubar les cèl·lules amb 5µg/ml de les lipoproteïnes marcades DiI-OxLDL o DiI-AcLDL durant 12 hores es va afegir al medi un excés de 40 vegades el pes molecular d'OxLDL, AcLDL o bé Albúmina humana. Després de rentar les cèl·lules amb PBS, es van rascar suaument i es

mesurà la captació de les lipoproteïnes marcades amb citometria de flux FACScan flow cytometer (BD Biosciences), adquirint 10.000 events per cada situació. La captació es va calcular com a percentatge respecte les cèl·lules control no tractat (THP-Vector o bé HMDM en presència d'Albúmina) indicat com a 100%.

17. Tractament de les cèl·lules THP1 per l'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant PCR quantitativa.

1.5×10^6 de cèl·lules THP1-hAIM o bé THP1-Vectors van ser incubades durant 24 hores en medi RPMI amb 3% BSA lliure d'àcids grassos suplementat amb 50 $\mu\text{g/ml}$ OxLDL, 1 μM T0901317 (T1317, Tocris Bioscience) i 1 μM 9cis-Retinoic Àcid (Sigma) o bé DMSO com a control negatiu. Després de 24 hores les cèl·lules es van recollir i rentar amb PBS i es va procedir a quantificar el mRNA dels gens CD36, SR-A, ABCA1, ABCG1 i SR-B1 mitjançant PCR a temps real, com s'ha indicat anteriorment.

18. Unió de hAIM a OxLDL o AcLDL.

Es va immobilitzar OxLDL o bé AcLDL a la placa de 96 pous (NUNC) de la següent manera: es plaquejà 50 μl d'OxLDL o bé AcLDL a una concentració de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ o bé BSA com a control negatiu per pou en la placa de 96 i es deixà durant tota la nit a temperatura ambient. El dia següent es va bloquejar la placa de qualsevol unió inespecífica amb 200 μl de PBS suplementat amb 5% de llet no grassa durant 1 hora a 37°C. Després de 3 rentats amb 0.05% PBS-Tween-20, es va afegir diferents concentracions de proteïna rhAIM diluïda amb PBS + 1% llet lliure de grassa i es deixà incubar 2 hores a temperatura ambient. La unió de rhAIM a les lipoproteïnes es va detectar amb l'anticòs anti hAIM biotinat (R&D Systems), diluït 1/2000 en PBS+1% llet desnatada, incubant-ho 90 minuts a temperatura ambient. Després de tres rentats amb PBS s'afegí l'anticòs secundari conjugat amb estreptavidina durant 30 minuts a temperatura ambient. La unió específica es va revelar TMB (Sigma Aldrich), després d'aturar la reacció amb àcid sulfúric es va llegir l'absorbància a 450 nm en un lector d'absorbància Varioskan Flash (Thermofisher).

19. Assaig de captació de DiI-OxLDL a través de CD36 en cèl·lules HEK-293.

La seqüència de cDNA de CD36 humà va ser sintetitzada per GenScript (Piscataway, NJ, USA), i posteriorment clonada en el vector pCI-neo mitjançant els enzims de restricció NheI/SmaI. La construcció pCi-neo-CD36 es va introduir en les cèl·lules competents *E.coli* JM109 (Promega) mitjançant xoc tèrmic. Els clons transformats amb la construcció pCi-neo-CD36 van ser seleccionats amb Ampicil·lina, i es va aïllar el plàsmid amb el kit comercial Minipreps (Promega), seguidament s'amplificà i seqüencià el plàsmid per verificar absències de mutacions (Big Dye 3.1, Applied Biosystems). 4µg del vector pCI-neo buit o bé del vector pCI-neo-CD36 es van transfectar de forma transitòria en les cèl·lules humanes d'origen embrional de ronyó HEK-293 utilitzant el kit comercial de transfecció: Tranfectin (Bio-Rad, California, USA). Dos dies després de la transfecció, es van plaquejar 50.000 cèl·lules/pous en els suport de portaobjectes per microscòpia Millicell EZ glass Slide (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) amb presència de 1µg/ml de rhAIM o bé 1µg/ml Albúmina humana com a control negatiu, i es van deixar incubant durant 24 hores amb 3µg/ml de DiI-OxLDL en medi Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) suplementat amb 5% sèrum fetal boví. A continuació les cèl·lules van ser fixades amb 4% paraformaldehid, incubades amb el tampó de bloqueig (PBS amb 3% BSA) i posteriorment incubades durant tota la nit a 4°C amb 1µg de l'anticòs monoclonal anti CD36, clona: 185-1G2, Antibody Workshop VI, disponible per l'amable cessió del Dr.Vilella; Hospital Clínic de Barcelona. El dia següent s'incubà les cèl·lules amb 40µg/ml de l'anticòs anti IgG de ratolí Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) en PBS-3% BSA durant 30 minuts. Entre els diferents passos es van realitzar rentats amb PBS per tal d'eliminar els anticossos no units. Es va realitzar el muntatge mitjançant el medi de muntatge Fluoromount Medium (SIGMA) i s'analitzà mitjançant el microscopi de fluorescència: Zeiss AxioObserver Z1, C. Zeiss, Germany equipat amb la càmera a AxioCam MRc i amb el programa AxioVision Rel. 4.8. Els valors mitjans de densitat òptica del DiI-OxLDL i del CD36 van ser quantificats utilitzant el programa ImageJ 1.46 (Rasband WS, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Es van obtenir imatges d'almenys 3 experiments independents. Per eliminar possibles diferències en l'expressió de CD36, només aquells camps amb tinció similar per CD36 van ser considerats per l'anàlisi. El percentatge de captació per DiI-OxLDL es va calcular com a quocient entre la mitjana de la densitat òptica de DiI-OxLDL i de CD36 per cada fotografia.

20. Anàlisi de l'expressió de CD36, CD11a i CD18 per citometria de flux.

10^5 THP1-Vector o THP1-hAIM van ser rentades amb el tampó de rentat (PBS, 2% FCS, 0.02% NaN₃), i incubades amb 1µg dels anticossos monoclonals anti CD36, anti CD11a (clona 33-1D2, Antibody Workshop II i IV), i anti CD18 (clona 68-5A5, Antibody Workshop III) en tampó de rentat suplementat amb 10% de sèrum humà AB durant 1 hora a 4°C. Després de rentar les cèl·lules, aquestes van ser incubades amb l'anticòs anti ratolí IgG conjugat amb FITC (BD Biosciences) durant 45 minuts a 4°C. Es van analitzar les cèl·lules per citometria de flux FACScan (BD Biosciences) adquirint 10.000 events per mostra.

21. Assaig d'adhesió de les cèl·lules THP1 a l'ectodomini d'ICAM-1.

El dia anterior a l'assaig es va immobilitzar la proteïna recombinat humana ICAM-1, rhICAM (PeproTech, London UK) a la placa de 96 pous (NUNC) a una concentració de 2,5 µg/ml en PBS lliure d'endotoxines (Grífols) o bé 1% Albúmina humana (Grífols) com a control negatiu i es va deixar durant tota la nit a 4°C. El dia següent es va bloquejar la placa amb 1% Albúmina Humana (Grífols) en RPMI durant 1 hora a 37°C. Els pous van ser rentat dues vegades amb PBS i tot seguit es van plaquejar, en triplicats, 5×10^5 de les cèl·lules en medi RPMI 2.5% FBS, 50 ng/ml PMA o bé amb RPMI 2.5% FBS, 50 ng/ml PMA suplementat amb OxLDL a una concentració de 50µg/ml durant 2 hores i 30 minuts a 37°C. A continuació les cèl·lules no adherides van ser eliminades en 3 rentats amb medi RPMI temperat a 37°C. Les cèl·lules adherides van ser fixades amb 10% formamida durant 15 minuts, i tenyides amb el colorant vital Cristall Violeta 0.1% (Sigma). L'excés de colorant va ser retirat després de 3 rentats amb aigua destil·lada i el colorant tenyint la cèl·lula va ser dissolt amb 2% SDS. L'absorbància a 590 nm va ser analitzada en un lector d'absorbància Varioskan Flash (Thermofisher). Per tal de quantificar el número de cèl·lules adherides es va generar una corba estàndard de concentracions conegudes de les dues línies cel·lulars THP1-Vector i THP1-hAIM (**Figura 18**).

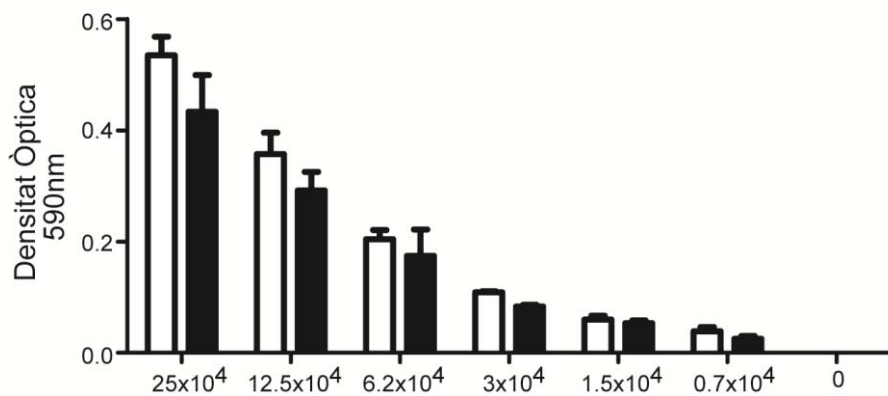


Figura 18. Corba patró per determinar el nombre de cèl·lules plaquejades mitjançant tinció amb Cristall Violeta. Es plaquejà diferents densitats cel·lulars conegudes de THP1-Vector (barres negres) i THP1-hAIM (barres blanques) diferenciades amb 50ng/ml PMA durant 48 hores en plaques de 96 pous. Després de retirar les cèl·lules no adherides mitjançant rentats amb RPMI, es va quantificar la proporció de cèl·lules adherides amb tinció per Cristall Violeta.

OBJECTIUS

AIM és una proteïna secretada per macròfags la qual s'ha demostrat que juga un paper rellevant en el procés ateroscleròtic en ratolins. A més, resultats recents la descriuen com un possible marcador de sèrum de condicions d'inflamació. La present tesi té com a objectiu principal aprofundir en el coneixement del paper de la proteïna AIM en els processos moleculars implicats en l'aterosclerosi en humans. Per això es desenvoluparan 2 objectius concrets.

Objectiu 1) Es determinarà els nivells d'AIM en sèrum durant l'aterosclerosi per estudiar el seu potencial com a biomarcador de sèrum del procés ateropàtic. Es compararan els nivells d'AIM en sèrum en models murins d'aterosclerosi i en pacients amb Arteriopatia Perifèrica (PAD).

Objectiu 2) S'estudiaran els mecanismes moleculars del macròfag implicats en l'aterosclerosi, com l'apoptosi, formació de cèl·lules escumoses (captació i eflux de colesterol) i adhesió a molècules endotelials.

RESULTATS i DISCUSSIÓ

Treball 1:

Anàlisi de l'expressió d'AIM durant la patologia de l'aterosclerosi.

Núria Amézaga*, Lucía Sanjurjo*, Josep Julve †,‡, Mar Naranjo-Gómez §,¶,||, Maria-Teresa Alzamora#, Guillem Pera#, Rosa Forés#, Pere Toran#, , Joan Carles Escolà-Gil †,‡, Francisco Blanco-Vaca †,‡,††, Francesc E. Borràs §,¶,||,‡‡, Annabel F. Valledor§§, Maria-Rosa Sarrias*.

* Innate Immunity Group, Health Sciences Research Institute Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain.

† CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas. CIBERDEM. 08036 Barcelona, Spain; ‡ Institut d'Investigacions Biomèdiques (IIB) Sant Pau. 08025 Barcelona. Spain.

§ Laboratory of Immunobiology for Research and Diagnosis (LIRAD),

¶ Blood and Tissue Bank (BST)

|| Health Sciences Research Institute Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain.

Resultats

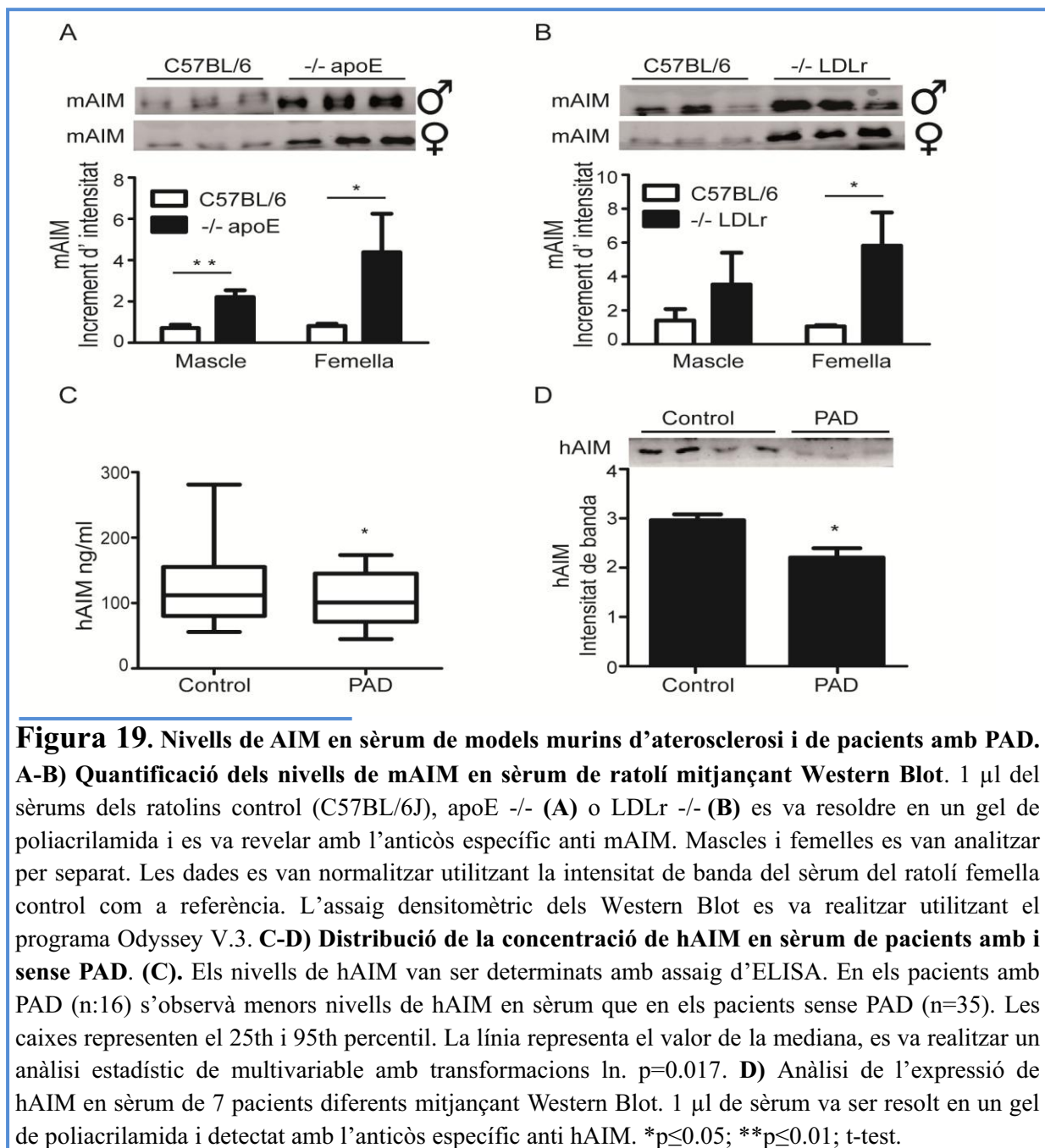
Els nivells de mAIM en sèrum dels models murins d'aterosclerosi augmenten, mentre que els nivells de hAIM en sèrum de pacients diagnosticats amb PAD disminueixen respecte els controls.

La presència de la proteïna AIM s'ha observat en els macròfags escumosos de les lesions ateroscleròtiques de ratolins i en humans [235] però tan sols la forma murina ha estat implicada en el desenvolupament de l'aterosclerosi per les seves característiques antiapoptòtiques. Per altra banda la proteïna AIM, s'ha detectat en el sèrum de diversos processos inflamatoris com la Dermatitis Atòpica en humans [244] o bé en sèrum de ratolins obesos [240], suggerint que aquestes alteracions podrien reflectir l'enllaç fisiològic dels nivells d'AIM en sèrum amb el procés patològic. És per aquest motiu que s'analitzà els nivells d'AIM en el sèrum dels models murins d'aterosclerosi i en pacient aterogènics.

Mitjançant l'anàlisi de la proteïna mAIM per Western Blot s'observà que els ratolins control C57BL/6 expressaven nivells de mAIM detectables en sèrum, i que aquests nivells augmentaven significativament en els dos tipus de models murins experimentals d'aterosclerosi; apoE^{-/-} (**Figura 19A**) o bé LDLr^{-/-} alimentats amb una dieta rica en greixos (**Figura 19B**). Les mostres van ser analitzades per separat segons el gènere degut a la diferència de la incidència de la malaltia dels ratolins mascles respecte els ratolins femella [197, 256] i posteriorment van ser normalitzades per poder comparar entre els dos sexes. Com s'observa en les gràfiques de les **Figures 19 A i B** l'increment dels nivells sèrics de mAIM en ratolins amb ateropatia enfront ratolins control era major en els ratolins femella. Segons aquests resultats s'hipotitzà que els nivells de la proteïna AIM en sèrum o plasma humans podrien també estar augmentats en aterosclerosi.

Per poder determinar si hAIM estava alterat en sèrum durant l'aterosclerosi, es procedí a estudiar els nivells de hAIM en sèrum de pacients amb PAD. Es volia valorar si hAIM podria esdevenir un biomarcador de la patologia, i així suplir la manca de biomarcadors sèrics acceptats en l'aterosclerosi en humans. Els nivells de hAIM van ser mesurats amb la tècnica d'ELISA en els sèrums provinents de l'estudi ARTPER de 16 pacients sans i 35 pacients amb PAD (veure taula descriptiva a material i mètodes). Mitjançant un anàlisi estadístic multivariable es va determinar que els nivells de hAIM en sèrum de pacients amb PAD eren significativament menors que en els pacients sans ($p=0.017$) (promig [rang interquartil]): 98

[61] enfront 116 [72] ng/ml) (**Figura 19C**). En els dos grups es van incloure pacients amb dislipidèmia, pacients tractats amb estatines (per reduir els nivells de colesterol en plasma), i pacients susceptibles a l'obesitat, però segons l'anàlisi estadístic cap d'aquestes condicions esmentades va resultar alterar els nivells d'AIM en sèrum. Paral·lelament, es van validar aquests resultats obtinguts mitjançant l'ELISA Comercial CircuLex Human AIM/CD5L/hAIM ELISA (MBL International). A més a més, mitjançant la tècnica de Western Blot es van confirmar els resultats de l'ELISA. Les dades de la **Figura 19 D** mostren com la presència de la proteïna hAIM en el sèrum de 4 pacients sans és major que en 3 pacients amb PAD.



Aquests resultats rebel·len diferències importants en la regulació de l'expressió d'AIM en sèrum durant l'aterogènesi en ratolí i en humans. Per intentar trobar una explicació a aquest fenomen, es procedí a analitzar l'expressió de hAIM *in vitro* en el macròfag sota diferents estímuls aterogènics.

L'expressió *in vitro* de hAIM es regulada pels lligands sintètics LXR/RXR i per OxLDL.

Ja que l'expressió de hAIM desapareix quan les cèl·lules són cultivades *in vitro* [238], es va generar un model cel·lular de macròfag capaç d'expressar establement hAIM, concretament en la línia cel·lular THP1. La validació de l'expressió de hAIM en les cèl·lules THP1 a nivell cel·lular o de secreció de la proteïna en el sobrenedant, doncs hAIM és una proteïna produïda i secretada pel macròfag, es va dur a terme mitjançant Western Blot. Com s'observa en la **Figura 20** es detectà la banda de hAIM de 38kDa amb un anticòs específic anti hAIM a nivell de llisat cel·lular (**Figura 20A**) i a nivell de sobrenedant de les cèl·lules transfectades establement amb hAIM (**Figura 20B**). Les cèl·lules transfectades amb hAIM es van anomenar THP1-hAIM i les cèl·lules control THP1-Vector. Com era d'esperar no s'observà l'expressió de hAIM en la línia cel·lular control (anomenades THP1-Vector).

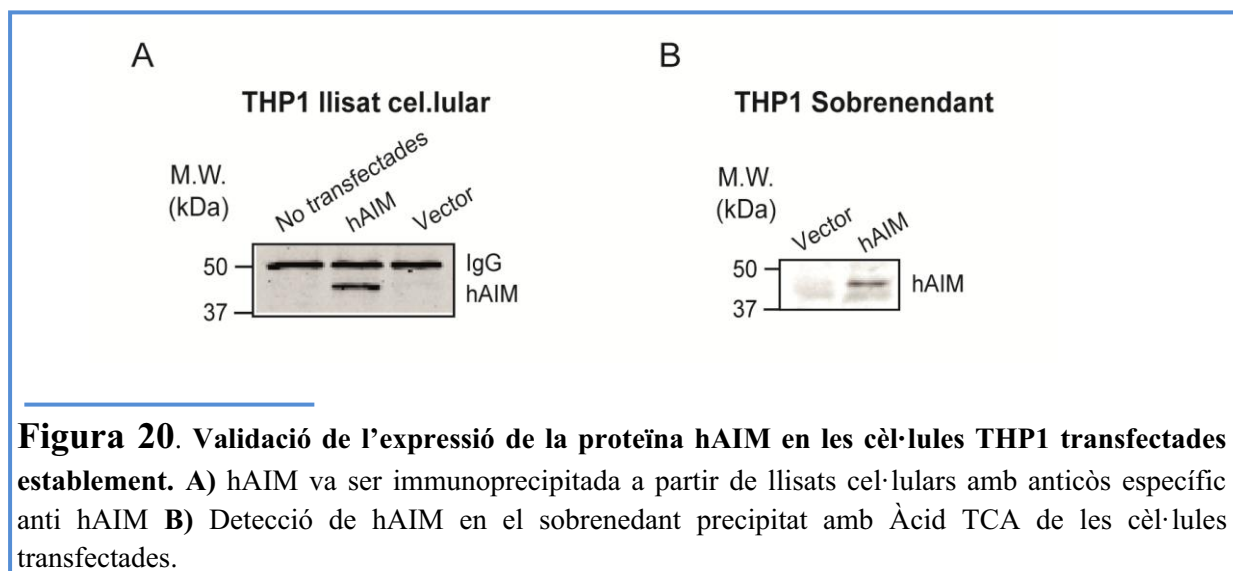
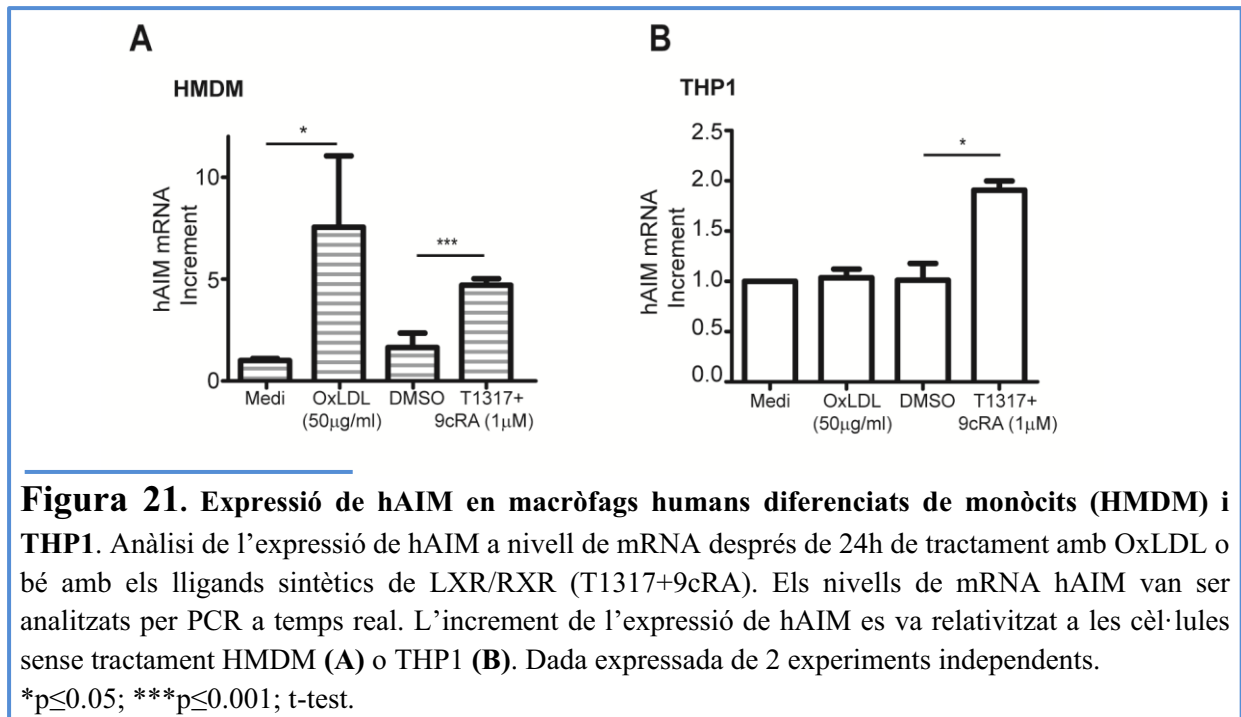


Figura 20. Validació de l'expressió de la proteïna hAIM en les cèl·lules THP1 transfectades establement. **A)** hAIM va ser immunoprecipitada a partir de llisats cel·lulars amb anticòs específic anti hAIM **B)** Detecció de hAIM en el sobrenedant precipitat amb Àcid TCA de les cèl·lules transfectades.

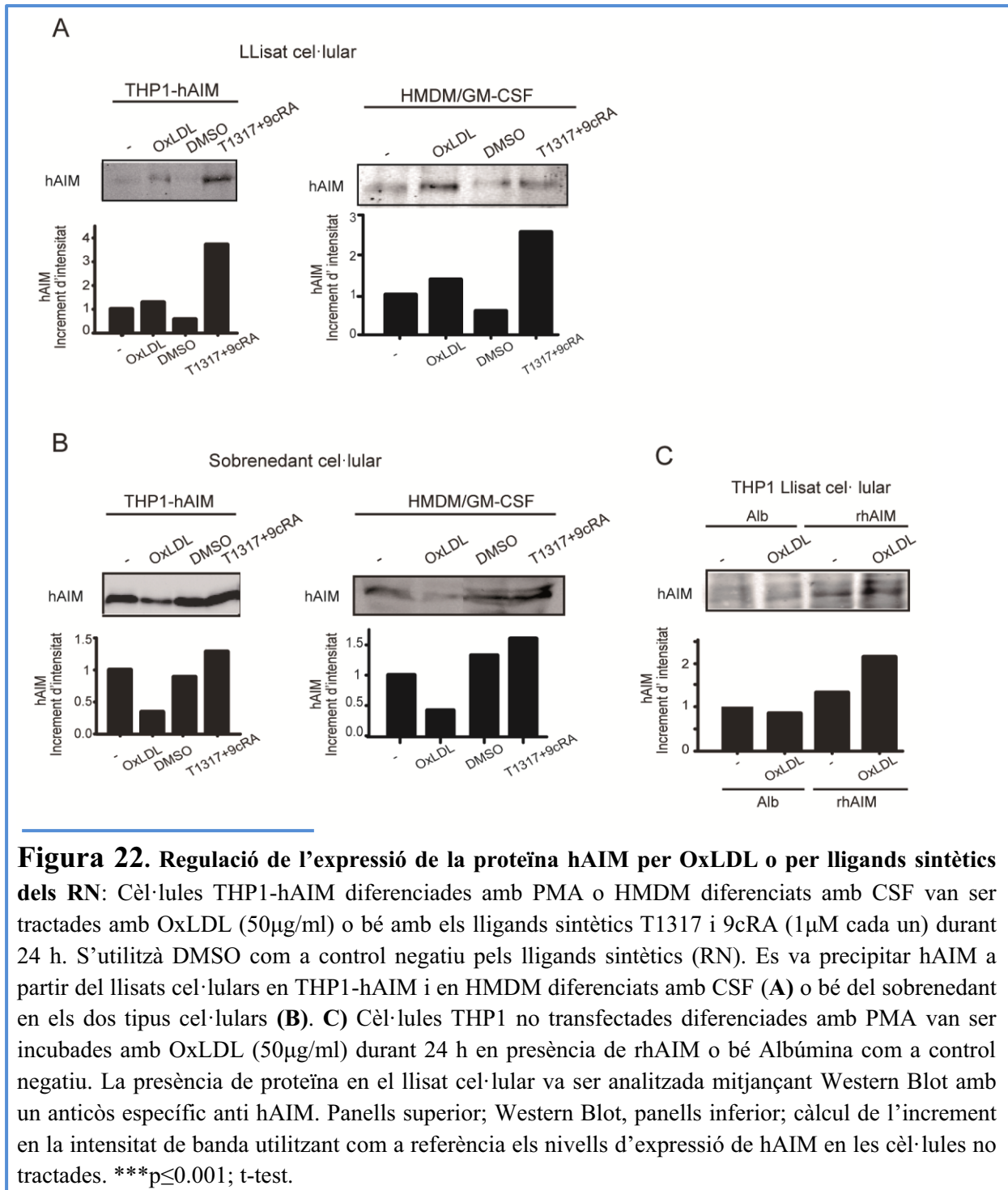
Diferents treballs han descrit que l'expressió de la forma murina d'AIM (mAIM) es veu induïda en macròfags quan aquests són incubats amb OxLDL [235] o bé amb els lligands sintètics de LXR/RXR [227, 228]. Tal i com s'observa en la **Figura 21A**, l'expressió de hAIM respon de manera homòloga a mAIM en macròfags humans diferenciats de monòcits

(HMDMs). Per contra l'expressió de mRNA de hAIM en les cèl·lules THP1 només es veu incrementada sota condicions d'incubació amb els lligands sintètics de LXR/RXR; T1317+9cRA (**Figura 21B**).



A continuació es va analitzar la regulació en l'expressió de la proteïna hAIM en les cèl·lules HMDM i en THP1. Tot i que les dades de PCR a temps real mostren expressió del mRNA de hAIM en totes les mostres, l'anàlisi del llisat de les cèl·lules HMDM o bé de les cèl·lules THP1-Vector no va detectar la presència de la proteïna hAIM (dades no mostrades). De fet com s'observa a la **Figura 22A**, tan sols les cèl·lules THP1-hAIM i els HMDM quan són diferenciats amb els factors de creixement CFS, com GM-CSF o bé M-CSF expressen la proteïna hAIM a nivell intracel·lular. Aquests nivells de proteïna intracel·lular basals augmentaven durant el tractament amb l'OxLDL o amb T1317+9cRA. Per altra banda, com s'observa en la **Figura 22B** la presència de proteïna en el sobrenedant (proteïna secretada hAIM) de cèl·lules THP1-hAIM o bé HMDM diferenciats amb els factors de creixement augmentava amb els lligands sintètics de LXR/RXR però quan les cèl·lules eren incubades amb OxLDL els nivells de hAIM disminuïen. Per trobar una explicació a aquests resultats, es procedí a analitzar la presència de la proteïna hAIM en el llisat de les cèl·lules THP1 després de l'addició exògena de la proteïna recombinant hAIM (rhAIM). Com era d'esperar en les cèl·lules THP1 incubades amb Albúmina no es va detectar la presència de la proteïna hAIM en el llisat cel·lular. En canvi, quan aquestes cèl·lules eren incubades amb una addició externa de hAIM (rhAIM) aleshores es va detectar hAIM en els llisats cel·lulars de THP1. A

més a més, els nivells de proteïna en els lisats augmentaven després del tractament amb OxLDL (**Figura 22C**). Les dades suggereixen que la proteïna hAIM present en el medi extracel·lular és capaç d'internalitzar-se i/o unir-se en la superfície cel·lular dels macròfags i que la presència d'OxLDL incrementa aquest efecte.



Discussió.

AIM és una proteïna molt abundant en sèrum i que s'ha detectat elevada en patologies associades a elevats graus d'inflamació [242-245]. Per aquest motiu, i amb l'objectiu d'analitzar el possible paper de hAIM com a biomarcador de malaltia ateroscleròtica, el nostre primer abordatge va ser analitzar la presència de la proteïna AIM durant aquesta patologia. Això es va fer tant en humans com en ratolins, ja que tot i l'elevada homologia en la seqüència aminoacídica entre les dues formes d'AIM, existeixen diferències específiques d'espècie en els seus patrons de glicosilació [233] que podrien resultar en diferents funcions [234].

Segons els resultats obtinguts s'observa una davallada en els nivells de hAIM en sèrum de pacients PAD respecte els pacients sans. Tot i que aquestes diferències són estadísticament significatives, no són suficients per utilitzar els nivells de hAIM en sèrum com a biomarcador de la patologia humana, a no ser que es combini amb altres factors analítics. Contràriament, en els dos models murins d'aterosclerosi estudiats s'observa que els nivells d'AIM en sèrum són significativament majors respecte els ratolins controls, suggerint així diferències en la regulació de la forma murina d'AIM en sèrum respecte la seva homòloga humana (hAIM).

Tot i aquestes diferències en els nivells d'AIM en sèrum de les dues espècies, els resultats presentats mostren que hAIM, al igual que mAIM [227], és regulada per l'activació dels receptors nuclears LXR/RXR, tant pels seus lligands sintètics com per OxLDL en les cèl·lules HMDM, suggerint així un control de la transcripció conservat en les dues formes d'AIM. Tot i això en les cèl·lules THP1, el tractament amb OxLDL no augmenta l'expressió de hAIM. Tot i que aquest fet necessita de posteriors estudis, hem de tenir en compte que THP1 és una línia cel·lular i encara que sigui un model cel·lular àmpliament acceptat per l'estudi de la homeòstasi lipídica en el macròfags, els resultats obtinguts amb els macròfags de diferents donants humans (HMDM) justifiquen que la regulació de hAIM depèn de l'activació de LXR no tant sols pels seus lligands sintètics sinó també per OxLDL.

Per altra banda, durant l'estudi de la proteïna hAIM, no s'ha detectat la presència d'aquesta en les cèl·lules THP1 o bé en HMDM. De fet, l'expressió de la proteïna hAIM només s'observa quan els HMDM són diferenciats amb factors de creixement CFS, concretament M-CSF o bé GM-CSF. Mitjançant estudis de PCR a temps real s'ha observat que els HMDM diferenciats amb M-CSF augmenten l'expressió de mRNA de hAIM respecte

a HMDM cultivats sense aquestes citocines (dades no mostrades). Aquestes dades indicarien que els CFS també estarien involucrats en incrementar la transcripció del mRNA de hAIM. Aquestes citocines estan involucrades en la supervivència, la proliferació i la diferenciació de cèl·lules progenitores mieloides així com en l'activació funcional de cèl·lules madures mieloides i s'ha descrit la implicació de les dues citocines en la patologia de l'aterosclerosi [118]. Diferents grups han suggerit que l'expressió de mAIM requereix un microambient específic, doncs la seva expressió desapareix en les cèl·lules en cultiu [238], i l'expressió de mAIM *in vitro* és incapaç de ser induïda per cap factor conegut com activador de macròfags incloent LPS, PMA o varies citocines [238]. Segons els nostres resultats, la diferenciació del macròfags amb CSFs incrementa la transcripció del mRNA de hAIM i en permet la traducció *in vitro*. Així doncs, les nostres dades també indiquen que l'expressió de hAIM està altament regulada, no només a nivell transcripcional si no també a nivell traduccional.

En aquest sentit, l'addició dels lligands sintètics de LXR/RXR a les cèl·lules HMDM diferenciades amb CSF o bé les cèl·lules THP1-hAIM fa augmentar l'expressió de la proteïna hAIM tant a nivell cel·lular com en el sobredant. En canvi, quan aquestes cèl·lules són tractades amb OxLDL, els nivells de proteïna hAIM disminueixen en els sobredants simultàniament amb un augment a nivell de llisat cel·lular. Aquests resultats estan en concordança amb dades publicades de la presència d'una elevada expressió de hAIM en els macròfags escumosos de les lesions ateroscleròtiques humanes [235]. Tot i això dels nostres resultats també s'infereix que a més de ser sobre expressada en el macròfag escumós, hAIM és retinguda en el macròfag. Tot i que el mecanisme implicat en l'acumulació de hAIM en els macròfags està per determinar, es proposa que aquesta acumulació és, almenys en part, per la internalització i/o el segrest de la proteïna hAIM en la superfície cel·lular. D'aquesta manera, la davallada en els nivells de hAIM en el sèrum de pacients PAD dona força a la idea que hAIM és atrapada en els macròfags que formen de la placa d'ateroma.

Treball 2:

Anàlisi de la participació de hAIM en els mecanismes moleculars del macròfag implicats en l'aterosclerosi.

Núria Amézaga*, Lucía Sanjurjo*, Josep Julve †,‡, Begoña Pérez-Cabezas §,¶,|| Patricia Bastos-Amador§,¶,||, Ramon Vilella#, Joan Carles Escolà-Gil †,‡, Francisco Blanco-Vaca †,‡,**, Francesc E. Borràs §,¶,||,††, Annabel F. Valledor‡‡, Maria-Rosa Sarrias*.

* Innate Immunity Group, Health Sciences Research Institute Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona

† CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas. CIBERDEM. Barcelona; ‡ Institut d'Investigacions Biomèdiques (IIB) Sant Pau, Barcelona.

§ Laboratory of Immunobiology for Research and Diagnosis (LIRAD),

¶ Blood and Tissue Bank (BST), || Health Sciences Research Institute Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona.

#Laboratory of Immunobiology, Hospital Clinic de Barcelona.

** Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

††Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona.

‡‡ Nuclear Receptor Group, Department of Physiology and Immunology, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona. Spain.

Resultats

hAIM protegeix els macròfags dels efectes apoptòtics d' OxLDL.

En estudis publicats anteriorment s'observà que mAIM és un factor aterogènic degut a que protegeix els macròfags dels efectes apoptòtics dels lípids oxidats [235]. Per determinar si hAIM mantenia les propietats antiapoptòtiques de la seva homologa murina, s'incubà les cèl·lules THP1 transfectades o no amb hAIM amb diferents concentracions d'OxLDL (**Figura 23A**) o bé amb l'agent apoptòtic Cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesi de proteïna (**Figura 23B**) i es va mesurar l'apoptosi per tinció d'Annexina V i 7AAD. En les cèl·lules control (THP1-Vector) es va observar un augment de l'apoptosi en resposta als tractaments. Per contra, les cèl·lules que expressaven hAIM eren resistents als efectes apoptòtics d'OxLDL i de CHX, tal i com es pot observar pel percentatge de cèl·lules apoptòtiques les qual eren similars al de les cèl·lules sense tractament. Així doncs es pot concloure que al igual que la forma murina d'AIM, hAIM és una molècula antiapoptòtica.

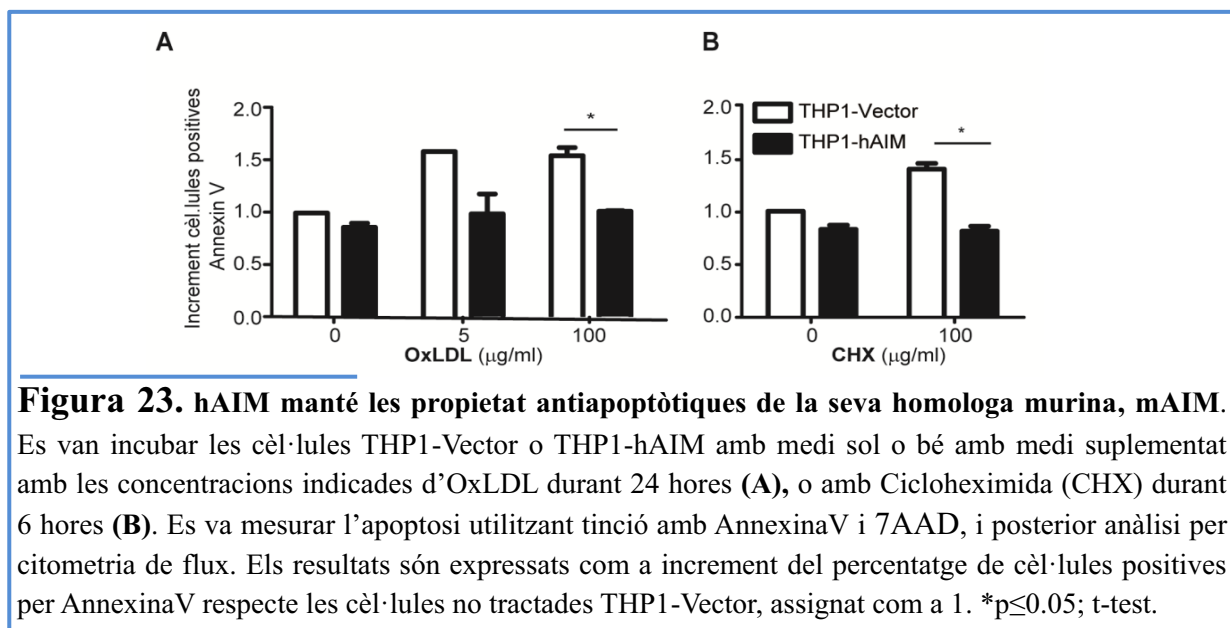


Figura 23. hAIM manté les propietat antiapoptòtiques de la seva homologa murina, mAIM. Es van incubar les cèl·lules THP1-Vector o THP1-hAIM amb medi sol o bé amb medi suplementat amb les concentracions indicades d'OxLDL durant 24 hores (**A**), o amb Cicloheximida (CHX) durant 6 hores (**B**). Es va mesurar l'apoptosi utilitzant tinció amb AnnexinaV i 7AAD, i posterior anàlisi per citometria de flux. Els resultats són expressats com a increment del percentatge de cèl·lules positives per AnnexinaV respecte les cèl·lules no tractades THP1-Vector, assignat com a 1. * $p \leq 0.05$; t-test.

hAIM augmenta la formació de macròfags escumosos.

A continuació s'analitzà si hAIM podia participar en el procés ateroscleròtic no només prevenint l'apoptosi dels macròfags, com la seva homòloga murina, sinó també modulant la resposta del macròfag durant el seu desenvolupament a macròfag escumós. La formació de cèl·lules escumoses es caracteritza per un increment en l'emmagatzematge citoplasmàtic dels èsters de colesterol i triglicèrids. Aquest emmagatzematge es pot visualitzar per tinció específica dels lípids; amb els colorants Oil Red O o bé Nile Red O, i anàlisi mitjançant microscòpia òptica o bé per citometria de flux, respectivament. Les cèl·lules THP1 i HMDM van ser incubades amb OxLDL durant 24 hores i van ser tenyides amb Oil Red O o Nile Red O. Tal i com s'observa en la **Figura 24A, Esquerra** les cèl·lules THP1-hAIM presenten major tinció d'Oil Red O respecte les cèl·lules control (THP1-Vector). Paral·lelament, els HMDM també acumulen major quantitats de lípids quan les cèl·lules són incubades amb la proteïna recombinant hAIM (rhAIM) respecte a les incubades amb Albúmina (**Figura 24A, Dreta**). Els resultats van ser els mateixos durant l'assaig de quantificació dels lípids tenyits amb Nile Red O en les cèl·lules THP1, on s'observà que la quantitat de lípid en el macròfag augmentava amb presència de hAIM (**Figura 24B**). Aquesta dada va ser confirmada amb la quantificació de colesterol total i èsters de colesterol en els HMDM mitjançant la tècnica de separació lipídica per cromatografia (TLC) i comptatge de colesterol marcat. Segons aquests resultats s'observa que hAIM incrementa la quantitat de colesterol total i èsters de colesterol en els HMDM tractats amb OxLDL respecte els tractats amb Albúmina com a control (**Figura 24C**). Aquests resultats indiquen que hAIM augmenta la formació dels macròfags escumosos.

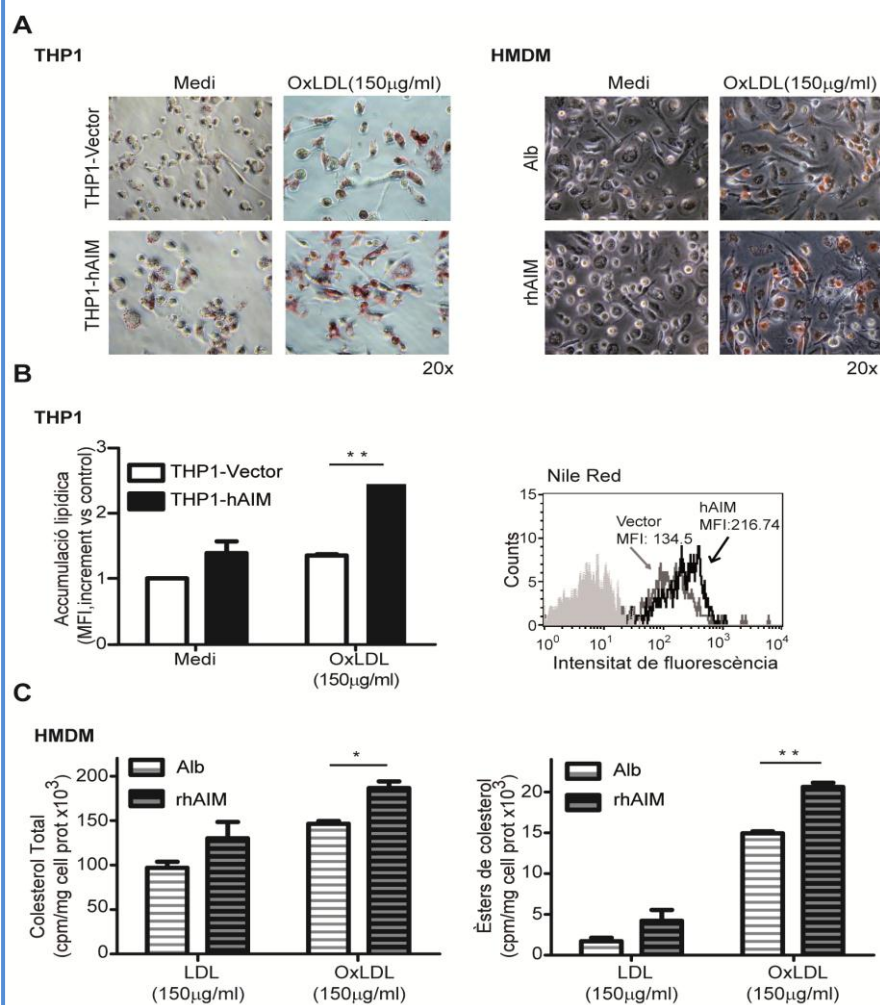


Figura 24. hAIM

augmenta la formació del macròfag escumós.

Les cèl·lules THP1 o HMDM van ser incubades amb 150µg/ml d'OxLDL durant 24 hores. El contingut lipídic es va examinar de la següent manera: **A)** Cèl·lules THP1 (esquerra) o cèl·lules HMDM (dreta) van ser fixades i tenyides amb Oil Red O i observades amb microscopi òptic **B)** Les cèl·lules THP1 van ser tenyides amb Nile Red O i analitzades per citometria de flux. Esquerra: Resultats de tres experiments, els resultats són expressats en relació a les cèl·lules THP1-Vector no tractades (assignat com a 1). Dreta:

Histograma representatiu de la intensitat de fluorescència de Nile Red O en cèl·lules THP1 tractades amb OxLDL. **C)** Quantificació de colesterol total (esquerra) o èsters de colesterol (dreta) en cèl·lules HMDM. HMDM de 3 donants diferents van ser incubats durant 24 hores amb Albúmina o amb rhAIM, després es va afegir 150µg/ml OxLDL en presència de Colesterol [³H] i es van analitzar les fraccions de colesterol cel·lular TLC amb líquid de centelleig. Colesterol total és la suma de colesterol lliure i colesterol esterificat. *p<0.05; **p<0.01; t-test.

hAIM no modifica l'eflux de colesterol.

La formació del macròfag escumós es pot dur a terme per un desequilibri entre la captació de lipoproteïnes modificades (mLDL) i la capacitat del macròfag per eliminar-les del seu interior, fenomen conegut com a eflux de colesterol [272]. Degut a la capacitat de hAIM en augmentar la formació del macròfag escumós, s'analitzà la participació de hAIM durant el procés de captació de mLDL i en el procés d'eflux de colesterol del macròfag.

L'eflux de colesterol des del macròfag es realitza a través dels membres de la família dels transportadors lipídics ABC, com ABCA1 i ABCG1, els quals són els responsables de

transportar el colesterol als seus acceptors lipídics apoA-1 i HDL, respectivament [273]. El receptor SR-B1 és un transportador amb característiques duals, ja que participa en l'eflux de colesterol bidireccional entre les cèl·lules i els acceptors de colesterol extracel·lulars [217].

S'analitzà si hAIM podia modular l'expressió dels nivells de mRNA de ABCA1, ABCG1 i SR-B1 mitjançant PCR a temps real en les cèl·lules THP1. Com es pot observar en la **Figura 25A** els nivells de mRNA de ABCA1 són similars entre THP1-Vector i THP1-hAIM, i el tractament amb OxLDL incrementa l'expressió de ABCA1 en les dues línies cel·lulars. Per contra, els nivells de mRNA d'ABCG1 són majors en les cèl·lules que expressen hAIM i aquests nivells augmenten després de l'estimulació amb OxLDL. Pel que fa a l'expressió de SR-B1, el tractament amb OxLDL augmenta per igual l'expressió de SR-B1 en les dues línies cel·lulars.

Tot seguit s'analitzà si aquests canvis a nivell de mRNA en ABCG1, en presència de hAIM, podien traduir-se a un canvi en la capacitat d'eflux de colesterol de l'interior cel·lular a l'espai extracel·lular. L'anàlisi es va dur a terme en les cèl·lules THP1 o HMDM, en presència o no de hAIM: les cèl·lules van ser diferenciades a macròfags escumosos mitjançant incubació amb AcLDL, seguidament es va afegir colesterol marcat amb ^3H i després d'afegir durant 4 hores els acceptors lipídics (plasma humà, apoA-I o bé HDL2) es quantificà el colesterol en l'interior i en l'exterior del macròfag.

S'assajà la proporció de l'eflux de colesterol en cèl·lules THP1 cap a diferents concentracions de l'acceptor plasmàtic humà, com es pot observar en la **Figura 25B** l'eflux de colesterol és significativament diferent i dosi dependent a les diferents concentracions de plasma humà, demostrant l'especificitat i/o sensibilitat de l'assaig, però la presència de hAIM no modifica l'eflux de colesterol en cèl·lules THP1.

Seguidament s'analitzà l'eflux de colesterol dels dos tipus cel·lulars, THP1 i HMDM cap als diferents acceptors; apoA-I, HDL2 i plasma humà al 2%. En l'eflux de colesterol cap plasma humà al 2% i apoA-I en cèl·lules THP1 o bé HMDM no s'observà modificat per la presència de hAIM (**Figura 25C**). Però quan s'utilitzà HDL2 com a acceptor, s'observà un increment en l'eflux de colesterol en les cèl·lules THP1-hAIM respecte les THP1-Vector. De totes maneres aquests resultats no es van reproduir en les cèl·lules HMDM, de manera que segons aquests resultats es suggereix que hAIM no té un paper rellevant en l'eflux de colesterol del macròfag.

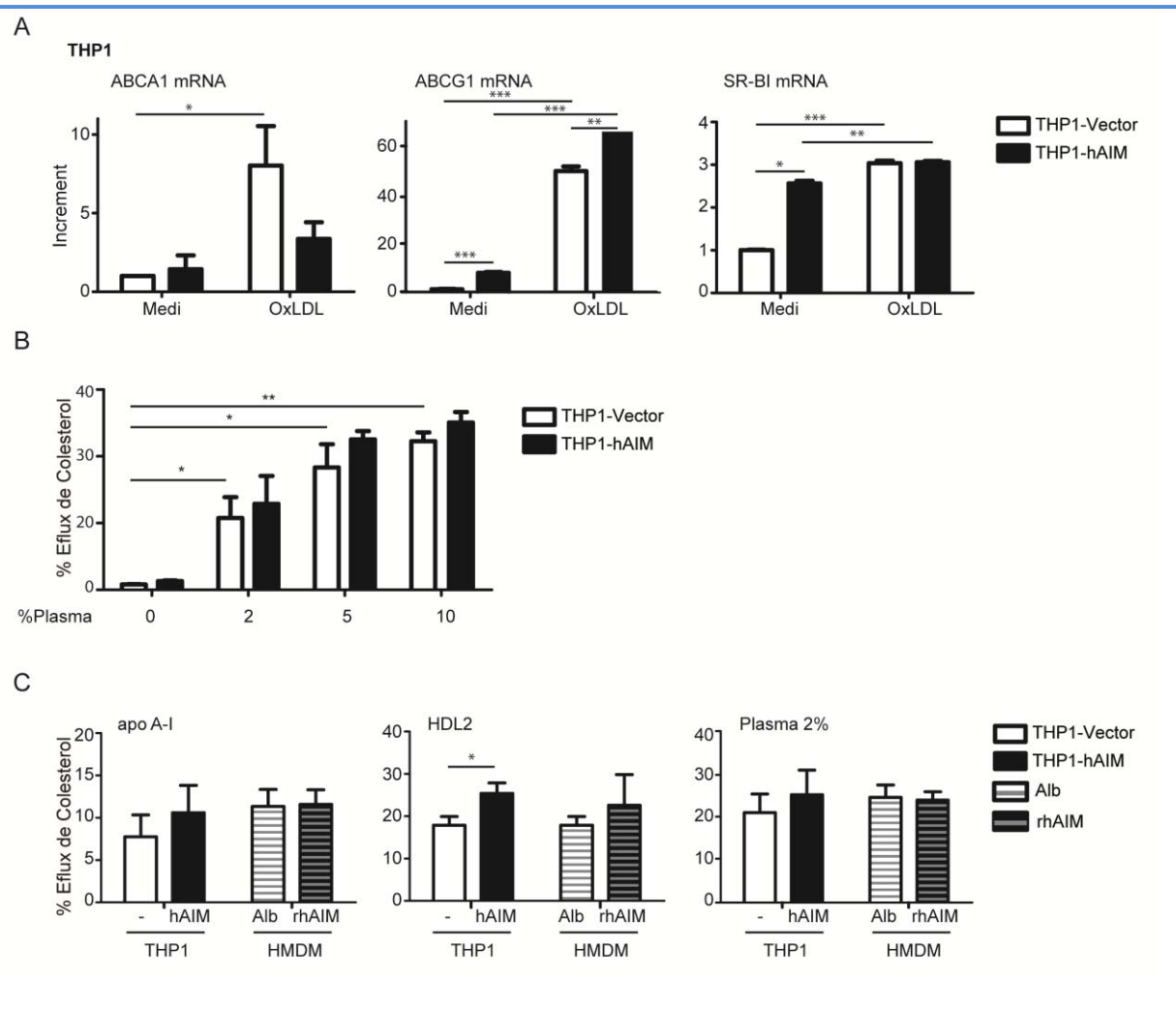
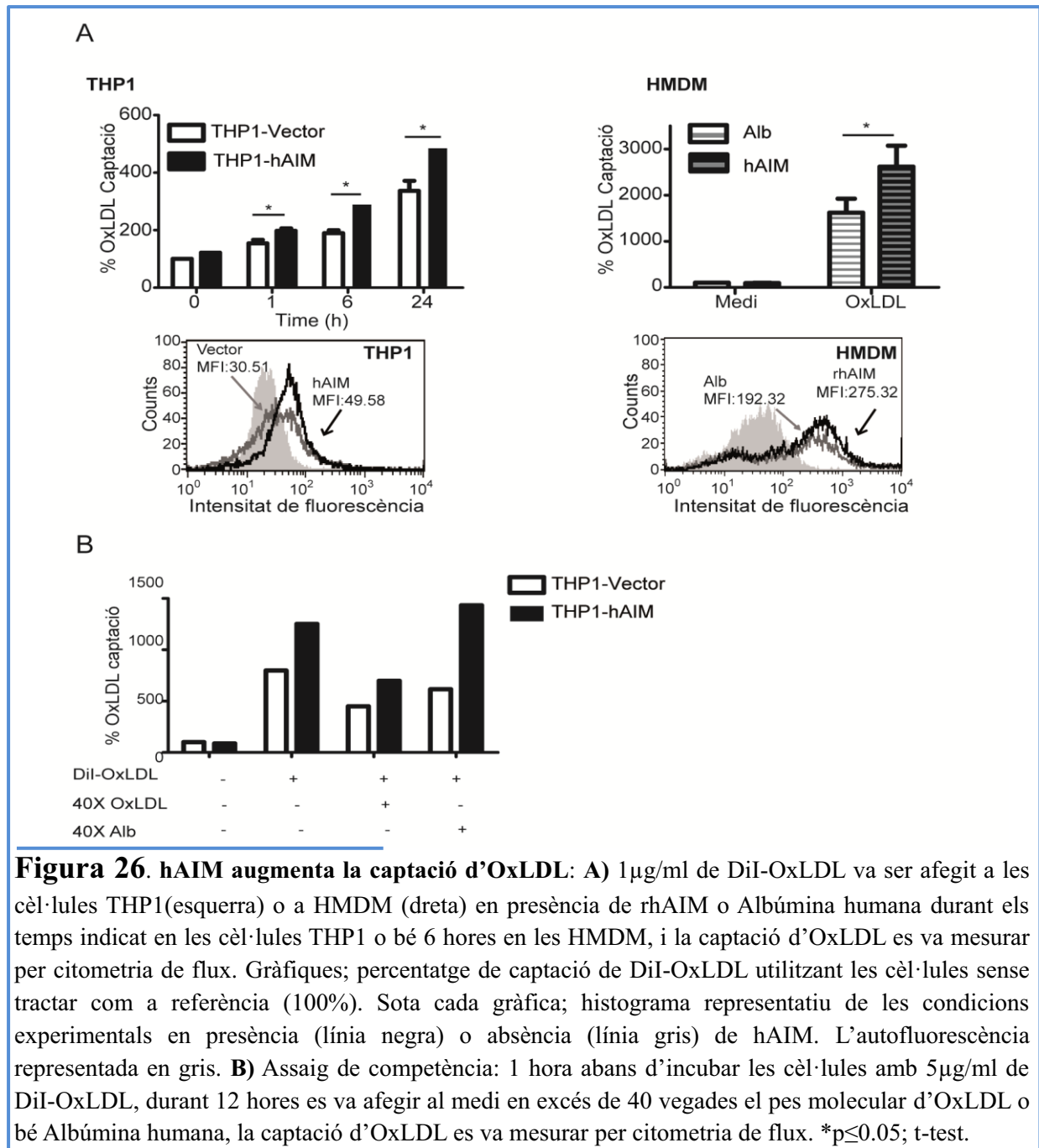


Figura 25. Participació de hAIM en l'eflux de colesterol. **A)** Participació de hAIM en l'expressió de transportadors lipídics. Les cèl·lules THP1 van ser incubades amb 50 µg/ml d'OxLDL durant 24 hores, i es va quantificar el mRNA de ABCA1, ABCG1 i SR-B1 mitjançant PCR a temps real. Les dades estan representades com increment respecte a les cèl·lules THP1 no tractades. Dades representatives de tres experiments diferents. **B)** Eflux de colesterol de les cèl·lules THP1 a diferents concentracions de plasma humà **C)** Eflux de colesterol en les cèl·lules THP1 i HMDM en presència de rhAIM. El colesterol marcat amb ³H va ser mesurat 4 hores després d'incubar amb plasma humà, apoA-I (25µg/ml), HDL2 (25µg/ml). Els gràfics representen els nivells del promig ± SEM de 3 experiments independents. *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001; t-test.

hAIM augmenta la captació d'OxLDL i AcLDL, s'uneix a les mLDL i facilita l'endocitosi d'OxLDL via CD36.

Seguidament es procedí a estudiar si la presència de hAIM podia modificar la captació de les LDL modificades. Les cèl·lules THP1 transfectades o HMDM van ser incubades amb OxLDL marcat amb fluorescència (DiI-OxLDL) durant diferents temps i s'analitzà la captació de fluorescència pel macròfag mitjançant citometria de flux. En la **Figura 26A** s'observa com

hAIM augmenta significativament la captació d'OxLDL en els dos tipus cel·lulars. Aquesta captació és específica ja que amb un excés d'OxLDL no marcat amb fluorescència s'observa competència per la captació, mentre que amb Albúmina no (Figura 26B).



Segons aquests resultats es suggereix que hAIM augmenta la captació d'OxLDL del macròfag. Degut a que CD36 és el principal Receptor Scavenger implicat en la captació d'OxLDL en macròfags [178] i que la forma murina d'AIM (mAIM) s'uneix a CD36 en la superfície del macròfag [240] s'hipotitzà que hAIM podria augmentar la captació d'OxLDL

modulant l'expressió i/o l'activitat de CD36. En aquest sentit, mitjançant estudis de PCR a temps real s'observà que en les cèl·lules THP1-hAIM l'expressió del mRNA per CD36 era major respecte les THP-Vector. Com s'observa en la **Figura 27A, dalt** el tractament amb OxLDL augmenta l'expressió de mRNA per CD36 en les dues línies cel·lulars, aquest augment correspon amb resultats publicats [274, 275], però aquest increment és significativament més elevat en les cèl·lules THP1-hAIM. Mitjançant estudis de tinció amb anticòs específic anti CD36 i posterior anàlisi per citometria de flux es va observar que hAIM augmenta l'expressió en la superfície cel·lular de CD36 en els dos tipus cel·lulars; THP1 i HMDM (**Figura 27, baix**). Segons aquests resultats es suggereix que hAIM augmenta l'expressió de CD36 tant a nivell de mRNA com de proteïna en la superfície cel·lular.

Una característica comuna als SR és la capacitat per reconèixer molècules polianióniques com l'OxLDL. Per tal l'analitzar si hAIM mantenia aquesta funció, es va assajar la unió directa de hAIM a OxLDL mitjançant un assaig d'ELISA. En l'assaig d'ELISA s'incubà diferents concentracions de rhAIM en pous prèviament immobilitzats amb OxLDL, la capacitat d'unió de la proteïna va ser detectada amb un anticòs específic anti hAIM. Com s'observa en la **Figura 27B**, rhAIM s'uneix de forma dosi dependent i de manera saturable a OxLDL.

Seguidament es procedí a analitzar la possibilitat que hAIM augmentés la captació d'OxLDL en el macròfag a través del CD36 mitjançant un model *in vitro* prèviament establert [168]; les cèl·lules HEK-293 transfectades amb el vector buit o bé amb la seqüència completa de CD36 van ser incubades durant 24 hores amb DiI-OxLDL amb presència de hAIM o bé d'Albúmina com a control negatiu, i s'analitzà la captació d'OxLDL mitjançant microscòpia de fluorescència. Com era d'esperar, en les cèl·lules HEK-293 transfectades amb el vector buit no s'observà tinció indicant nul·la o baixa capacitat d'endocitosi d'OxLDL i aquesta resposta no es veu alterada per l'addició de rhAIM (dades no mostrades), suggerint el requeriment d'un receptor cel·lular per la captació. Per contra, l'expressió de CD36 en les cèl·lules HEK-293 incrementa la capacitat endocítica d'OxLDL i quan aquestes cèl·lules són tractades amb rhAIM, s'observa un increment significatiu en la captació d'OxLDL respecte les cèl·lules tractades amb Albúmina, **Figura 27C**. Segons aquests resultats es suggereix que hAIM facilita la captació d'OxLDL en les cèl·lules HEK-293 que expressen CD36.

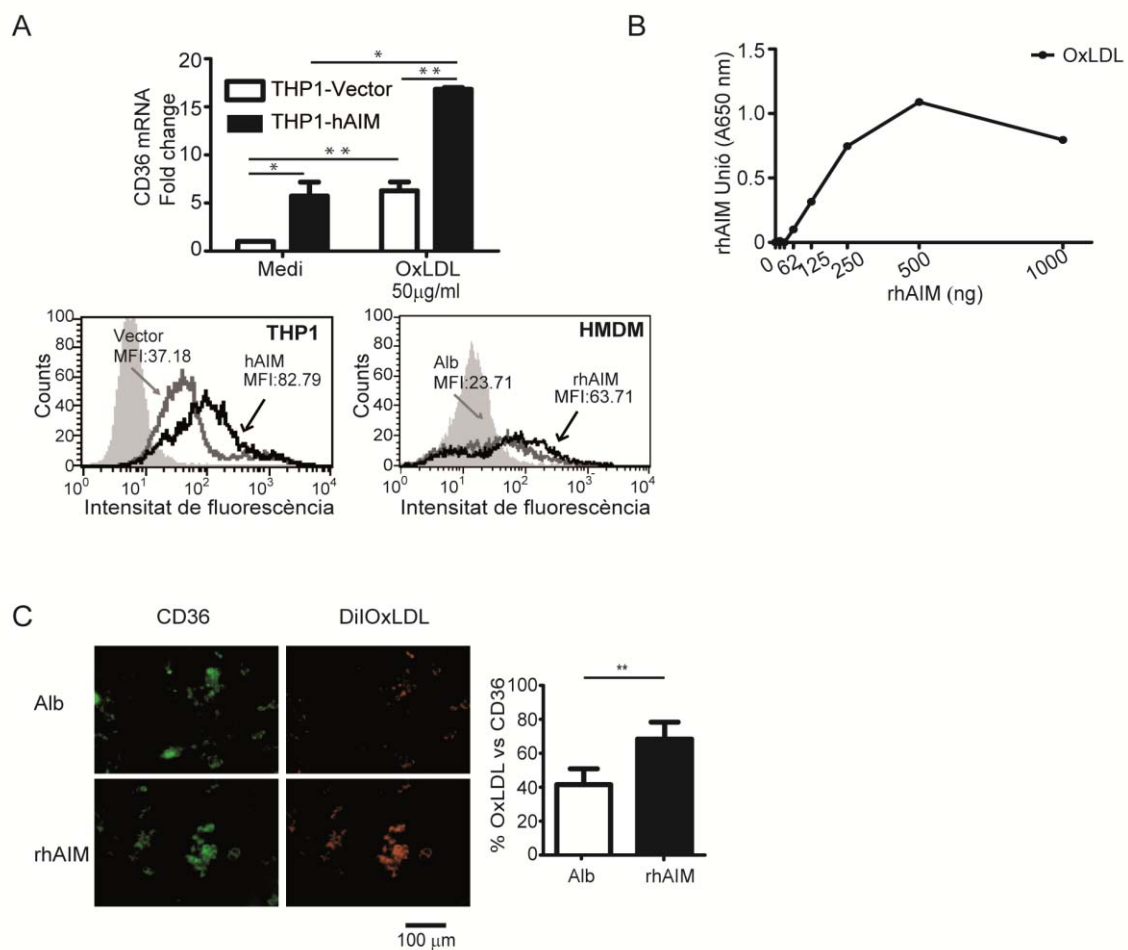


Figura 27. A) hAIM augmenta l'expressió gènica de CD36. Les dues línies cel·lulars THP1-hAIM i THP1-Vector van ser incubades amb 50µg/ml d'OxLDL durant 24 hores, la quantitat de mRNA de CD36 va ser mesurada amb PCR a temps real. S'utilitzà com a gen constituïtiu la Ciclofilina A. Els resultats són expressats com a canvi en l'increment de l'expressió respecte les cèl·lules THP1-Vector sense tractar. **Sota:** Anàlisi de l'expressió de CD36 en la superfície cel·lular de les línies cel·lulars THP1 i HMDM en presència de rhAIM mitjançant citometria de flux. Auto fluorescència en gris. **B) ELISA d'unió de hAIM a OxLDL.** Les proteïnes control BSA o bé OxLDL van ser immobilitzades en la placa d'ELISA i incubades amb diferents concentracions de rhAIM. La unió de hAIM va ser detectada amb un anticòs policlonal biotinat seguit d'estreptavidina. Dades de un sol experiment, representatiu de 3 experiments individuals. **C) hAIM participa en la captació d'OxLDL mitjançant el receptor CD36.** Cèl·lules HEK-293 transfectades amb CD36 van ser incubades amb 3µg/ml de DiI-OxLDL en presència de rhAIM (1µg/ml) o bé Albúmina com a control negatiu, durant 24 hores a 37°C. Cèl·lules van ser fixades i tenyides amb anticòs específic per CD36 i analitzades per microscopi de fluorescència. Esquerra: Fotos representatives de les cèl·lules HEK-293 expressant CD36 i tractades amb Alb o rhAIM. Fluorescència verda: Tinció per cèl·lules CD36 positives, Fluorescència vermella: tinció per cèl·lules positives per la captació de DiI-OxLDL. Dreta: La mitjana de la densitat òptica de DiI-OxLDL i de CD36 va ser quantificada mitjançant el programa ImageJ de 3 experiments diferents. El percentatge de tinció per DiI-OxLDL es va calcular com a quocient entre la mitjana de la intensitat òptica de DiI-OxLDL respecte CD36. *p≤0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001; t-test.

Per altra banda, també s'analitzà la implicació de hAIM durant el desenvolupament del macròfag escumós per captació d'AcLDL. En aquest cas, el principal receptor d'AcLDL en el macròfag és Receptor Scavenger A (SR-A) [145]. S'observà que les cèl·lules THP1 en presència de hAIM tenien majors nivells de mRNA SR-A respecte les cèl·lules THP1-Vector i aquest augment s'incrementava quan les cèl·lules eren incubades amb OxLDL (**Figura 28A**).

Segons els resultats obtinguts, hAIM també augmenta l'emmagatzematge lipídic del macròfag durant la incubació amb AcLDL: com s'observa en la **Figura 28B** aquest augment va ser detectat per tinció lipídica amb Oil Red O (**Esquerra**) o bé mitjançant tinció amb Nile Red O (**Dreta**). Aquestes dades van ser confirmades en experiments on l'addició de la proteïna rhAIM en les cèl·lules HMDM augmentava els nivells de Colesterol Total (**Figura 28C Esquerra**) i els nivells dels Èsters de colesterol (**Figura 28C Dreta**) respecte les cèl·lules tractades amb Albúmina. Aquest augment era degut a la participació de hAIM en la captació d'AcLDL pel macròfag ja que durant els assajos de captació d'AcLDL marcat amb fluorescència DiI (DiI-AcLDL) (**Figura 28D**) s'observà que les cèl·lules THP1 (**esquerra**) o HMDM (**esquerra**), en presència de hAIM eren capaces de captar major quantitat de DiI-AcLDL. Aquesta captació era específica ja que la presència d'un excés d'AcLDL no marcat amb fluorescència en el medi l'inhibia, mentre l'Albúmina no (dades no mostrades). A més, mitjançant ELISA es va observar que hAIM també s'uneix a AcLDL (**Figura 28E**).

Així doncs segons aquests resultats es suggereix que hAIM és capaç de modular la formació del macròfag escumós per captació de lipoproteïnes modificades, tant AcLDL com OxLDL.

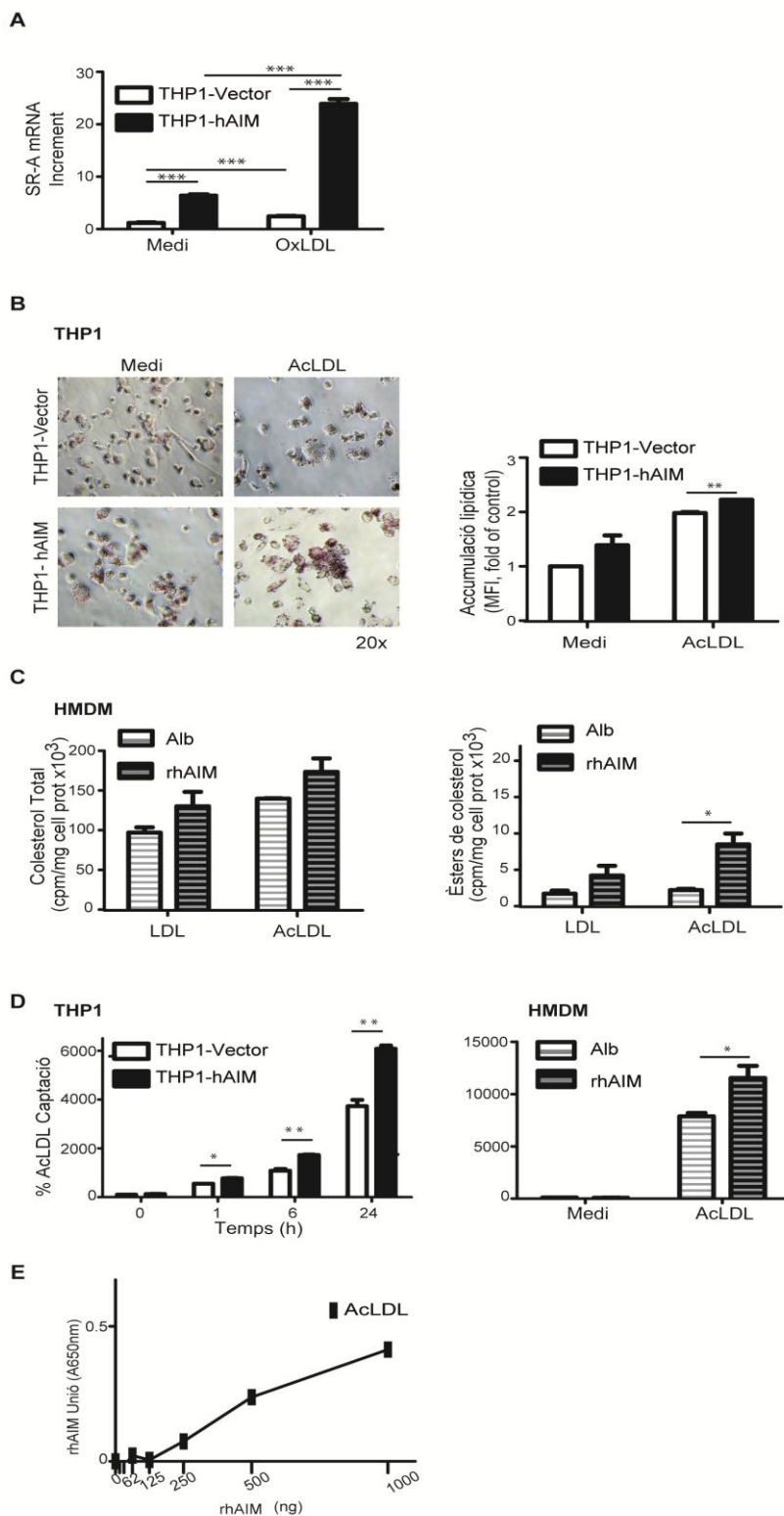


Figura 28. A) hAIM augmenta l'expressió gènica de SR-AI. Les dues línies cel·lulars THP1-hAIM i THP1-Vector van ser incubades amb 50µg/ml d'OxLDL durant 24 hores, la quantitat de mRNA de CD36 va ser mesurada amb PCR a temps real B-C) hAIM augmenta la formació de macròfag escumós B) Cèl·lules THP1 van ser fixades i tenyides amb Oil Red O i observades amb microscopi òptic (esquerra) o bé tenyides amb Nile Red O i analitzades per citometria de flux (dreta) C) Quantificació de colesterol total i èsters de colesterol en cèl·lules HMDM de 3 donants diferents. Es va analitzar les fraccions de colesterol cel·lular TLC amb líquid de centelleig. Colesterol total és la suma de colesterol lliure i colesterol esterificat. D) Captació de DiI-AcLDL: 10µg/ml de DiI-AcLDL va ser afegit a les cèl·lules THP1 (esquerra) o 1 µg/ml a HMDM (dreta) en presència de rhAIM o Albúmina durant els temps indicats en les cèl·lules THP1 o bé durant 6 hores en les HMDM, la captació d'AcLDL es va mesurar per

citometria de flux. Percentatge de captació de DiI-AcLDL utilitzant les cèl·lules sense tractar com a referència (100%). B) ELISA d'unió de hAIM a AcLDL. Les proteïnes control BSA o bé AcLDL van ser immobilitzades en la placa d'ELISA i incubades amb diferents concentracions de rhAIM. La unió a hAIM va ser detectada amb un anticòs policlonal biotinat seguit de SA-PO. Dades de un sol experiment, representatiu de 3 experiments individuals. *p<0.05; **p<0.01; t-test

hAIM augmenta l'expressió de les integrines CD11a i CD18b (LFA-1) i consegüentment l'adhesió de les cèl·lules THP1 a la proteïna endotelial ICAM-1.

En l'acumulació de cèl·lules escumoses en la paret arterial i la formació de la placa d'ateroma hi participa activament la migració del macròfag cap a l'espai subendotelial, aquest fenomen es deu a la interacció entre les integrines presents en els macròfags i les respectives molècules d'adhesió expressades en les cèl·lules endotelials [59]. Concretament la molècula d'adhesió intracel·lular ICAM-1 es troba expressada en les lesions ateroscleròtiques i regula l'adhesió del macròfag mitjançant la unió a l'heterodímer format per les integrines CD11a i CD18, anomenat LFA1. Durant la caracterització de les cèl·lules THP1 transfectants per hAIM mitjançant citometria de flux, s'observà que en aquestes cèl·lules l'expressió de les dues integrines CD11a i CD18 (LFA-1) doblaven els valors de tinció respecte les cèl·lules THP1-Vector (**Figura 29A**). És per això que s'analitzà la capacitat de hAIM de modular l'adhesió de les cèl·lules THP1 a ICAM. Això es va realitzar immobilitzant una forma recombinant de l'ectodomini de ICAM (rhICAM) a plaques d'ELISA i analitzant l'adhesió dels transfectants THP1 mitjançant tinció amb el colorant Cristall Violeta. Com s'observa en la **Figura 29B**, hAIM dobla l'adhesió de les cèl·lules THP1 a rhICAM-1 respecte les cèl·lules THP1 que no expressen hAIM, i aquest augment s'incrementa amb el tractament amb OxLDL. Aquests resultats suggereixen que les cèl·lules que expressen hAIM tenen major capacitat per adherir-se a rhICAM-1, perquè incrementen l'expressió del seu contra-receptor LFA-1.

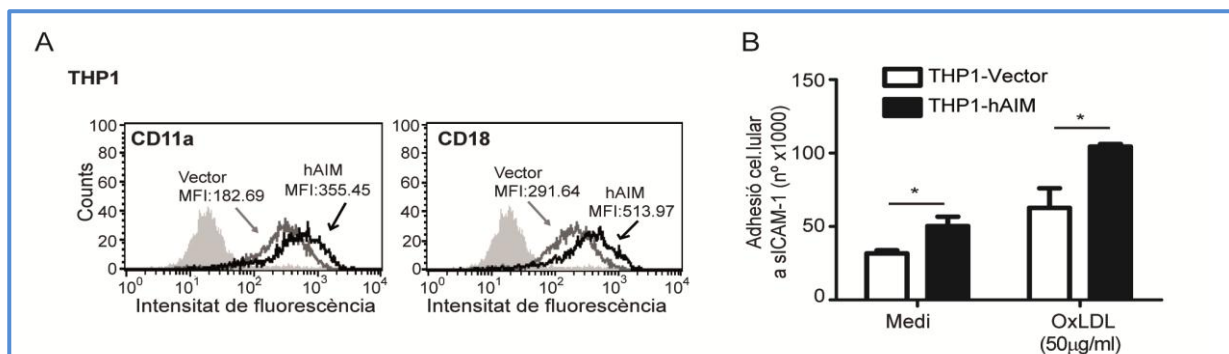


Figura 29. A) Anàlisi de l'expressió de CD11a i CD18 en la superfície cel·lular de THP1 transfectant. L'histograma gris representa el control negatiu d'Isotip IgG. Histogrames representatius de 3 experiments diferents. B) Cèl·lules THP1 en presència o absència de 50µg/ml OxLDL van ser afegides a plaques d'ELISA prèviament tractades amb rhICAM-1 o bé Albúmina humana com a control negatiu durant 2 hores i 30 minuts. Les cèl·lules no adherides van ser eliminades amb 3 rentats i les cèl·lules restants adherides van ser tenyides amb Cristall de Violeta. L'adhesió va ser quantificada utilitzant una recta patró d'un nombre conegut de cèl·lules. La unió a Albúmina va ser mesurada com a unió no específica i els seus valors van ser restats dels valors específic de la unió a rhICAM-1. Resultat representatiu de 4 experiments independents. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; t-test.

Discussió.

La participació de mAIM en el procés de l'aterosclerosi en models murins rau en el seu paper antiapoptòtic, augmentant la supervivència del macròfag, contribuint així en la formació de la placa d'ateroma [235]. És per aquest motiu que en la present tesi s'estudia si la seva homòloga humana, hAIM, conserva en primer lloc les propietats antiapoptòtiques. Segons els resultats obtinguts s'observa que les cèl·lules THP1-hAIM són resistents tant a Cicloheximida com a OxLDL, de manera que es suggereix que la funció protectora de mAIM en els macròfags enfront dels efectes apoptòtics es conservada també en la forma humana.

A més a més, mitjançant estudis de la formació dels macròfags escumosos per captació de mLDL es suggereix una nova funció de hAIM, aquesta és capaç d'incrementar l'emmagatzematge lipídic en el macròfag. L'acumulació de colesterol en la cèl·lula pot ser deguda a una disminució de l'eflux de colesterol, per un augment de la captació lipídica, o bé pels dos fenòmens. Per aquest motiu es va estudiar la capacitat d'eflux de colesterol com a possible mecanismes involucrat en l'acumulació de lípids induïts per hAIM. Els experiments mitjançant PCR a temps reals van suggerir que tan sols els nivells de mRNA pel transportador ABCG1, però no ABCA1, són significativament majors en les cèl·lules THP1 que expressen hAIM. En concordança amb aquests resultats, l'eflux de colesterol cap a apoA-1 (acceptor del transportador lipídic ABCA1) en les cèl·lules THP1 i en HMDM no és modificat per la presència de hAIM. A més s'observa que l'augment en l'expressió del transportador ABCG1 està associat a un augment en l'eflux de colesterol dels macròfags cap al seu acceptor (HDL) en les cèl·lules THP1. Però, tot i això, aquest augment no es va reproduir en les cèl·lules HMDM. Així doncs s'hipotitza que hAIM no juga un paper important en l'eflux de colesterol cap a HDL. Per confirmar aquesta premissa, es va testar com hAIM no modifica l'eflux de colesterol quan s'utilitza plasma humà com a acceptor de colesterol. Tenint en compte que el plasma és l'acceptor de colesterol més fisiològic degut al seu ampli rang de lipoproteïnes i apolipoproteïnes presents en ell, aquests resultats confirmen la mínima o nul·la contribució de hAIM en el mecanisme d'eflux de colesterol.

De fet, segons els resultats obtinguts en el present treball es suggereix que la participació de hAIM en la formació del macròfag escumós es degut a un augment en la captació lipídica pel macròfag. Recentment ha estat publicat que mAIM s'uneix a CD36 en la superfície cel·lular d'adipòcits i macròfags i aquest és endocitat a l'interior cel·lular a través de CD36 [240]. Segons aquesta dada, juntament amb el fet que CD36 és el principal Receptor Scavenger en la captació d'OxLDL, s'hipotitzà que hAIM podria augmentar la captació

d'OxLDL modulant l'expressió i/o l'activitat de CD36. Certament, segons els resultats, s'observa que l'expressió de hAIM provoca l'augment en la regulació de CD36 a nivell de mRNA en les cèl·lules THP1-hAIM enfront de les cèl·lules THP1-Vector, i aquest augment s'incrementa després del tractament amb OxLDL. A més a més, l'aportació exògena de rhAIM en les cèl·lules HMDM incrementa l'expressió de CD36 en membrana respecte el tractament amb la proteïna Albúmina.

Després d'aquests resultats s'analitzà si hAIM podria actuar com a proteïna soluble capaç d'unir-se a OxLDL. De fet, mitjançant assajos d'ELISA s'observa que la forma recombinant de hAIM s'uneix de forma dosi dependent i saturable a OxLDL. La unió de hAIM a OxLDL és d'una important rellevant, doncs AIM està composta exclusivament per dominis SRCR. Aquests dominis consten d'uns 100 aminoàcids, 6-8 residus de cisteïna amb ponts disulfur ben conservats [144]. Els dominis SRCR estan presents en proteïnes descrites amb funcions d'unió a lípids i control de l'homeòstasi, com SR-AI i el receptor de macròfag amb estructura de col·lagen: MARCO [276]. Però, en el domini SRCR mai ha estat demostrada la seva interacció amb OxLDL. L'alta homologia estructural i l'elevada conservació filogènica dels dominis SRCR han ajudat en la resolució de moltes de les funcions de les proteïnes SRCR, com la seva unió a bacteries [277, 278]. La troballa que hAIM s'uneix a OxLDL obre la possibilitat que altres proteïnes SRCR, podrien unir-se també a formes oxidades de LDL. A més a més, la unió de rhAIM a OxLDL suggereix que podria ser útil com a proteïna soluble capaç de transferir OxLDL al receptor CD36. Aquesta hipòtesi ha estat analitzada en un model *in vitro* àmpliament utilitzat en les cèl·lules HEK-293 [168]. Quan les cèl·lules HEK-293 que expressaven CD36 eren incubades amb rhAIM aquestes augmentaven la captació d'OxLDL mentre que les cèl·lules tractades amb Albúmina no. D'aquesta manera, els resultats suggereixen que hAIM facilita la captació d'OxLDL a través de CD36 en les cèl·lules HEK-293. Aquests resultats, juntament amb l'augment d'expressió per CD36, podrien explicar l'augment de captació d'OxLDL en el macròfag en presència de hAIM. Restaria per veure si la captació d'OxLDL mediada per hAIM indueix la seva retenció i/o internalització en el macròfag, la qual cosa explicaria les troballes del Treball 1 d'aquesta tesi.

La participació d'AIM en la captació de mLDL i conseqüent formació del macròfag escumós també ha estat corroborada en estudis d'endocitosi d'AcLDL. Els resultats mostren que hAIM augmenta la formació de macròfag escumós en presència de les principals lipoproteïnes modificades utilitzades en els models d'aterosclerosi: OxLDL i AcLDL. Els nostres resultats suggereixen que hAIM media la internalització d'OxLDL a través de CD36, i

quedaria per determinar si l'augment en la captació d'AcLDL és deguda només a l'augment de l'expressió de SR-A o també a la participació de hAIM com a proteïna soluble capaç de transferir AcLDL al receptor SR-A.

Així doncs, en resum, en el present treball s'observa que hAIM és una proteïna aterogènica la qual participa en múltiples processos de l'homeòstasi del macròfag, incloent la supervivència, la captació de mLDL i la conseqüent formació dels macròfags escumosos, així com també l'adhesió a rhICAM-1. Aquests resultats són de vital importància per entendre els principals events cel·lulars que contribueixen a l'aterosclerosi.

DISCUSSION GENERAL

En la present tesi s'estudia la participació de la forma humana d'AIM durant l'aterosclerosi ja que la implicació d'aquesta proteïna durant l'aterogènesi tan sols havia estat suggerida en models murins [235]. Gràcies als models murins ha estat possible resoldre moltes qüestions respecte els mecanismes involucrats en l'aterosclerosi, però el fet que existeixen diferències entre la patologia en ratolins respecte en humans fa que el model no sigui suficient per estudiar algunes de les seves etapes [279, 280]. A més a més, existeixen diferències a nivell d'expressió i en les modificacions post transcripcionals de la proteïna AIM en les dues espècies, humana i murina, que suggereixen diferències en la seva funcionalitat [231, 232].

Els nostres resultats suggereixen que hAIM, al igual que mAIM, és un dels principals gens diana dels Receptors Nuclears, una família de factors de transcripció que centren l'interès de molts grups de recerca pel seu potencial ús terapèutic, no tan sols a nivell d'aterosclerosi [203] sinó en patologies com l'Alzheimer [206] diabetis [207], o bé càncer de pròstata [281]. Per tant, el nostre treball té un valor afegit perquè aporta dades sobre la translacionalitat de la funció d'AIM en el context de l'aterosclerosi, que podrien ser extensibles a altres patologies regulades per la funció dels RN.

Un dels nostres primers objectius es referia a investigar el potencial ús dels nivells de hAIM en sèrum com a biomarcador de PAD. Malgrat la davallada observada, les diferències no són prou marcades com per animar-nos a iniciar estudis amb una nombre més elevat de pacients per establir els nivells de hAIM en plasma com a biomarcador. A més a més s'ha de tenir en compte que les concentracions plasmàtiques o sèriques de hAIM s'han reportat modificades en diverses patologies d'origen inflamatori, com són la cirrosi hepàtica [242, 243], dermatitis atòpica [244] i malaltia de Kawasaki [245]. Per tant, degut a les baixes diferències observades entre els controls i els pacients amb PAD, una petita alteració dels nivells de hAIM degut a un procés inflamatori paral·lel podria alterar l'especificitat de la determinació per la patologia ateroescleròtica en concret.

Per altra banda, en els estudis més funcionals, les dades presentades impliquen hAIM en l'aterosclerosi no tan sols per les seves propietats antiapoptòtiques [235], sinó que es suggereix per primer cop el caràcter aterogènic de hAIM. El fet que hAIM esdevingui una molècula proaterogènica obre la possibilitat de plantejar el desenvolupament d'inhibidors

d'AIM com a teràpia antiaterogènica. Gràcies al coneixement dels Receptors Scavengers (SR) implicats en els mecanismes moleculars que promou l'aterosclerosi, com CD36, SR-A o bé SR-PSOX, ha estat possible el disseny d'estratègies antiaterogèniques [186]. Entre aquestes estratègies es destaca principalment la manipulació gènica dels SR. Els estudis més rellevants en manipulació gènica es poden classificar en tres estratègies; mitjançant l'expressió ectòpica del SR com per exemple CD36 [282] o bé de LOX-1[283] en teixit hepàtic, on s'ha demostrat la davallada de l'OxLDL, disminuint així les lesions ateroscleròtiques en ratolins deficients en apoE. Una altra estratègia consisteix en augmentar l'expressió de les formes solubles de SR. En aquest sentit estudis realitzats per Jalkanen i col·laboradors suggereixen que la forma soluble de SR-A s'uneix a les mLDL impedit la unió amb la proteïna SR-A present en la membrana del macròfag, i reduint així la formació dels macròfags escumosos [284]. I per últim, una altra estratègia consisteix en inhibir l'expressió dels SR mitjançant "Knock out" o bé RNA d'interferència, interferint així en la formació de macròfags escumosos, com és el cas de la reducció del Receptor Scavenger SR-PSOX en monòcits humans [285].

Així doncs el coneixement que hAIM augmenta la formació del macròfag escumós obre noves vies d'investigació en la recerca d'estratègies antiaterogèniques.

Els resultats presentats de la interacció de la proteïna hAIM a les formes modificades de LDL, suggeririen que hAIM podria estar no només implicada en la patologia de l'aterosclerosi sinó també en altres patologies iniciades o perjudicades per la presència d'OxLDL, com la Diabetis Mellitus [286] o bé malalties autoimmunitàries com el lupus [287] o l'artritis reumatoide [288].

CONCLUSIONS

1/ Els nivells de proteïna AIM en sèrum durant el procés d'aterosclerosi en models murins respecte a pacients amb ateropatia perifèrica (PAD) són regulats de forma diferent.

- Els nivells de mAIM en sèrum dels models murins d'aterosclerosi LDLr^{-/-} i apoE^{-/-} augmenten significativament respecte els nivells dels ratolins control.
- Els nivells de hAIM en sèrum de pacients diagnosticats amb PAD, mitjançant l'índex ITB, disminueixen respecte els pacients controls. Tot i això les diferències no són suficients per considerar els nivells de hAIM en sèrum com a biomarcador de PAD.

2/ La regulació de l'expressió de hAIM és modulada durant el procés aterogènic.

- La regulació del RNAm de hAIM depèn de l'activació dels factors nuclears LXR/RXR per formes oxidades de les lipoproteïnes (OxLDL) així com pels seus lligands sintètics T1317+9cRA en els macròfags humans diferenciats de monòcits de sang perifèrica (HMDM).
- L'expressió de hAIM, a nivell de mRNA s'incrementa pels factors de creixement CSF, com M-CSF.
- L'expressió de la proteïna hAIM, a nivell de llistat cel·lular, tan sols es detecta quan els HMDM són diferenciats amb els factors de creixement CSF, i en les cèl·lules THP1 establiment transfectades amb hAIM. La incubació amb OxLDL o amb els lligands sintètics dels RN, T1317+9cRA, augmenta la seva expressió.
- Els nivells de proteïna hAIM en el sobrenedant disminueixen durant el tractament amb OxLDL en cèl·lules HMDM diferenciades amb CSF i en cèl·lules THP1-hAIM, mentre que amb els lligands sintètics dels RN T1317+9cRA augmenta.
- La proteïna hAIM present en el medi extracel·lular és capaç d'internalitzar-se o unir-se a la superfície del macròfag, i aquest fenomen s'incrementa en presència d'OxLDL.

3/ hAIM manté les propietats antiapoptòtiques de la seva homòloga mAIM.

4/ hAIM incrementa la formació del macròfag escumós augmentant la captació de lipoproteïnes modificades sense modificar l'eflux de colesterol.

-L'expressió de hAIM en la línia cel·lular THP1 i la seva adició a HDMD indueix l'acumulació de lípids intracel·lulars.

-La formació de macròfags escumosos per part de hAIM és deguda a un increment de la captació i no a una variació dels mecanismes d'eflux.

-hAIM indueix l'expressió dels principals Receptor Scavenger implicats en la captació de lipoproteïnes modificades: CD36 i SR-A.

-hAIM s'uneix de forma específica a OxLDL i a AcLDL.

-hAIM facilita l'endocitosi d'OxLDL mitjançant el receptor CD36.

5/ hAIM augmenta l'expressió de les integrines CD11a i CD18b (LFA-1) i consegüentment l'adhesió de les cèl·lules THP1 a la proteïna endotelial ICAM-1.

REFERÈNCIES

1. WHO publishes definitive atlas on global heart disease and stroke epidemic. *Indian J Med Sci*, 2004. **58**(9): p. 405-6.
2. Yusuf, S., et al., *Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2746-53.
3. Drouet, L., *Atherothrombosis as a systemic disease*. *Cerebrovasc Dis*, 2002. **13 Suppl 1**: p. 1-6.
4. Mautner, G.C., S.L. Mautner, and W.C. Roberts, *Amounts of coronary arterial narrowing by atherosclerotic plaque at necropsy in patients with lower extremity amputation*. *Am J Cardiol*, 1992. **70**(13): p. 1147-51.
5. McGill, H.C., Jr., et al., *Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth*. *Circulation*, 2000. **102**(4): p. 374-9.
6. Stamler, J., et al., *Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity*. *JAMA*, 2000. **284**(3): p. 311-8.
7. Goldbourt, U., *The ratio of HDL to total cholesterol: long-term prognosis in men with and without coronary heart disease and in different ages, ethnic origins and serum cholesterol categories*. *Prog Clin Biol Res*, 1988. **255**: p. 37-48.
8. Alexander, R.W., *Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective*. *Hypertension*, 1995. **25**(2): p. 155-61.
9. Assmann, G., et al., *Coronary heart disease prevention task force*. *Eur Heart J*, 1999. **20**(11): p. 841-4.
10. Allayee, H., et al., *Families with familial combined hyperlipidemia and families enriched for coronary artery disease share genetic determinants for the atherogenic lipoprotein phenotype*. *Am J Hum Genet*, 1998. **63**(2): p. 577-85.
11. von Eckardstein, A., H. Schulte, and G. Assmann, *Increased risk of myocardial infarction in men with both hypertriglyceridemia and elevated HDL cholesterol*. *Circulation*, 1999. **99**(14): p. 1925.
12. Fichtenberg, C.M. and S.A. Glantz, *Association of the California Tobacco Control Program with declines in cigarette consumption and mortality from heart disease*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(24): p. 1772-7.
13. Vcev, A., et al., *Helicobacter pylori infection and coronary artery disease*. *Coll Antropol*, 2007. **31**(3): p. 757-60.
14. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(2): p. 115-26.
15. Chen, Z., et al., *Serum cholesterol concentration and coronary heart disease in population with low cholesterol concentrations*. *BMJ*, 1991. **303**(6797): p. 276-82.
16. Newman, A.B., et al., *Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(3): p. 538-45.
17. Bitton, A. and T.A. Gaziano, *The Framingham Heart Study's impact on global risk assessment*. *Prog Cardiovasc Dis*. **53**(1): p. 68-78.
18. Conroy, R.M., et al., *Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project*. *Eur Heart J*, 2003. **24**(11): p. 987-1003.
19. Buitrago, F., et al., *Original and REGICOR Framingham functions in a nondiabetic population of a Spanish health care center: a validation study*. *Ann Fam Med*. **9**(5): p. 431-8.

20. D'Agostino, R.B., Sr., et al., *General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study*. *Circulation*, 2008. **117**(6): p. 743-53.
21. Ramos, R., et al., *Derivation and validation of REASON: a risk score identifying candidates to screen for peripheral arterial disease using ankle brachial index*. *Atherosclerosis*, 2011. **214**(2): p. 474-9.
22. Alzamora, M.T., et al., *The peripheral arterial disease study (PERART/ARTPER): prevalence and risk factors in the general population*. *BMC Public Health*, 2010. **10**: p. 38.
23. Baena-Diez, J.M., et al., *Ankle-brachial index improves the classification of cardiovascular risk: PERART/ARTPER Study*. *Rev Esp Cardiol*. **64**(3): p. 186-92.
24. Vasan, R.S., *Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations*. *Circulation*, 2006. **113**(19): p. 2335-62.
25. Ferri, N., R. Paoletti, and A. Corsini, *Biomarkers for atherosclerosis: pathophysiological role and pharmacological modulation*. *Curr Opin Lipidol*, 2006. **17**(5): p. 495-501.
26. Ridker, P.M., *Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention*. *Circulation*, 2003. **107**(3): p. 363-9.
27. Haidari, M., et al., *Evaluation of C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, as a risk factor for stable coronary artery disease*. *Clin Biochem*, 2001. **34**(4): p. 309-15.
28. Koenig, W., et al., *C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992*. *Circulation*, 1999. **99**(2): p. 237-42.
29. Taylor, F., et al., *Statins for the primary prevention of cardiovascular disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013. **1**: p. CD004816.
30. Gould, A.L., et al., *Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials*. *Circulation*, 1998. **97**(10): p. 946-52.
31. Becker, D.J., et al., *Simvastatin vs therapeutic lifestyle changes and supplements: randomized primary prevention trial*. *Mayo Clin Proc*, 2008. **83**(7): p. 758-64.
32. Schwandt, P. and A.J. Brady, *Achieving lipid goals in Europe: how large is the treatment gap?* *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2004. **2**(3): p. 431-49.
33. Srinivasan, S.R., et al., *Low density lipoprotein retention by aortic tissue. Contribution of extracellular matrix*. *Atherosclerosis*, 1986. **62**(3): p. 201-8.
34. Kang, S. and R.A. Davis, *Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1529**(1-3): p. 223-30.
35. Walters, M.J. and S.P. Wrenn, *Mechanistic roles of lipoprotein lipase and sphingomyelinase in low density lipoprotein aggregation*. *J Colloid Interface Sci*, 2011. **363**(1): p. 268-74.
36. Horton, J.D., et al., *Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(7): p. 1067-76.
37. Cushing, S.D., et al., *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(13): p. 5134-8.
38. Henriksen, T., E.M. Mahoney, and D. Steinberg, *Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(10): p. 6499-503.
39. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis*. *Annu Rev Biochem*, 1983. **52**: p. 223-61.
40. Nievelstein, P.F., et al., *Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue*. *Arterioscler Thromb*, 1991. **11**(6): p. 1795-805.
41. Camejo, G., et al., *Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis*. *Atherosclerosis*, 1998. **139**(2): p. 205-22.

42. Henriksen, T., E.M. Mahoney, and D. Steinberg, *Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein*. *Arteriosclerosis*, 1983. **3**(2): p. 149-59.
43. Morel, D.W., P.E. DiCorleto, and G.M. Chisolm, *Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation*. *Arteriosclerosis*, 1984. **4**(4): p. 357-64.
44. Yla-Herttuala, S., et al., *Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(4): p. 1086-95.
45. Steinbrecher, U.P., *Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. **959**(1): p. 20-30.
46. Cathcart, M.K., et al., *Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin*. *J Immunol*, 1989. **142**(6): p. 1963-9.
47. Olszewski, A.J. and K.S. McCully, *Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids*. *Free Radic Biol Med*, 1993. **14**(6): p. 683-93.
48. Winterbourn, C.C. and A.C. Carr, *Myeloperoxidase-dependent loss of malondialdehyde: a limitation for detecting neutrophil-mediated lipid peroxidation*. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **302**(2): p. 461-7.
49. Sigal, E., C.W. Laughton, and M.A. Mulkins, *Oxidation, lipoxigenase, and atherogenesis*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **714**: p. 211-24.
50. Bjorkhem, I. and U. Diczfalusy, *Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(5): p. 734-42.
51. Levitan, I., S. Volkov, and P.V. Subbaiah, *Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology*. *Antioxid Redox Signal*. **13**(1): p. 39-75.
52. Ross, R., *Cell biology of atherosclerosis*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 791-804.
53. Luscher, T.F. and M. Barton, *Biology of the endothelium*. *Clin Cardiol*, 1997. **20**(11 Suppl 2): p. II-3-10.
54. Kinlay, S., P. Libby, and P. Ganz, *Endothelial function and coronary artery disease*. *Curr Opin Lipidol*, 2001. **12**(4): p. 383-9.
55. Badimon, L., et al., *Endothelium and atherosclerosis*. *J Hypertens Suppl*, 1992. **10**(2): p. S43-50.
56. Munoz, C., et al., *Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity*. *Blood*, 1996. **88**(9): p. 3482-90.
57. Nelken, N.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(4): p. 1121-7.
58. Rajavashisth, T.B., et al., *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins*. *Nature*, 1990. **344**(6263): p. 254-7.
59. Jang, Y., et al., *Cell adhesion molecules in coronary artery disease*. *J Am Coll Cardiol*, 1994. **24**(7): p. 1591-601.
60. Ip, J.H., et al., *Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation*. *J Am Coll Cardiol*, 1990. **15**(7): p. 1667-87.
61. Gorski, D.H. and K. Walsh, *Mitogen-responsive nuclear factors that mediate growth control signals in vascular myocytes*. *Cardiovasc Res*, 1995. **30**(4): p. 585-92.
62. Fox, C.S., et al., *Kidney function is inversely associated with coronary artery calcification in men and women free of cardiovascular disease: the Framingham Heart Study*. *Kidney Int*, 2004. **66**(5): p. 2017-21.
63. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. *Circulation*, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
64. Lievens, D. and P. von Hundelshausen, *Platelets in atherosclerosis*. *Thromb Haemost*. **106**(5): p. 827-38.

65. Li, Z., et al., *Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis*. Thromb Res. **127**(3): p. 184-8.
66. van Gils, J.M., J.J. Zwaginga, and P.L. Hordijk, *Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(2): p. 195-204.
67. Ferroni, P., et al., *Low-density lipoprotein-lowering medication and platelet function*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2006. **35**(3-4): p. 346-54.
68. Vanderlaan, P.A. and C.A. Reardon, *Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis*. J Lipid Res, 2005. **46**(5): p. 829-38.
69. Naruko, T., et al., *Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2894-900.
70. Podrez, E.A., et al., *Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro*. J Clin Invest, 1999. **103**(11): p. 1547-60.
71. Zhou, X., et al., *Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice*. Circulation, 2000. **102**(24): p. 2919-22.
72. Davenport, P. and P.G. Tipping, *The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Am J Pathol, 2003. **163**(3): p. 1117-25.
73. Daugherty, A. and D.L. Rateri, *T lymphocytes in atherosclerosis: the yin-yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation*. Circ Res, 2002. **90**(10): p. 1039-40.
74. Dansky, H.M., et al., *T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4642-6.
75. Song, L., C. Leung, and C. Schindler, *Lymphocytes are important in early atherosclerosis*. J Clin Invest, 2001. **108**(2): p. 251-9.
76. Soilleux, E.J., et al., *Human atherosclerotic plaques express DC-SIGN, a novel protein found on dendritic cells and macrophages*. J Pathol, 2002. **198**(4): p. 511-6.
77. Bobryshev, Y.V., et al., *Evidence that dendritic cells infiltrate atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice*. Histol Histopathol, 2001. **16**(3): p. 801-8.
78. Yilmaz, A., et al., *Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques*. Atherosclerosis, 2004. **176**(1): p. 101-10.
79. Cao, W., et al., *Dendritic cells in the arterial wall express C1q: potential significance in atherogenesis*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(1): p. 175-86.
80. Perrin-Cocon, L., et al., *Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3785-91.
81. Alderman, C.J., et al., *Effects of oxidised low density lipoprotein on dendritic cells: a possible immunoregulatory component of the atherogenic micro-environment?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(4): p. 806-19.
82. Millonig, G., G.T. Malcom, and G. Wick, *Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study*. Atherosclerosis, 2002. **160**(2): p. 441-8.
83. Seko, Y., et al., *Perforin-secreting killer cell infiltration in the aortic tissue of patients with atherosclerotic aortic aneurysm*. Jpn Circ J, 1997. **61**(12): p. 965-70.
84. Clerc, G. and P.M. Rouz, *Lymphocyte subsets in severe atherosclerosis before revascularization*. Ann Intern Med, 1997. **126**(12): p. 1004-5.
85. Tupin, E., et al., *CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis*. J Exp Med, 2004. **199**(3): p. 417-22.
86. Xaus, J., et al., *Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis*. Immunobiology, 2001. **204**(5): p. 543-50.
87. Villedor, A.F., et al., *Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(4): p. 405-17.

88. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
89. Gordon, S., *The macrophage: past, present and future*. Eur J Immunol, 2007. **37** Suppl 1: p. S9-17.
90. Landsman, L. and S. Jung, *Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3488-94.
91. Sindrilaru, A., et al., *An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice*. J Clin Invest. **121**(3): p. 985-97.
92. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
93. Cros, J., et al., *Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors*. Immunity. **33**(3): p. 375-86.
94. Kuroda, E., et al., *SHIP represses the generation of IL-3-induced M2 macrophages by inhibiting IL-4 production from basophils*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3652-60.
95. Moro, K., et al., *Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells*. Nature. **463**(7280): p. 540-4.
96. Pesce, J., et al., *The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 2044-55.
97. Satoh, T., et al., *The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection*. Nat Immunol. **11**(10): p. 936-44.
98. Kristiansen, M., et al., *Identification of the haemoglobin scavenger receptor*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 198-201.
99. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
100. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
101. Kropf, P., et al., *Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo*. FASEB J, 2005. **19**(8): p. 1000-2.
102. Odegaard, J.I. and A. Chawla, *Alternative macrophage activation and metabolism*. Annu Rev Pathol. **6**: p. 275-97.
103. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
104. Stokes, K.Y., *Microvascular responses to hypercholesterolemia: the interactions between innate and adaptive immune responses*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(7-8): p. 1141-51.
105. Staunton, D.E., et al., *Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families*. Cell, 1988. **52**(6): p. 925-33.
106. Reilly, P.L., et al., *The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1*. J Immunol, 1995. **155**(2): p. 529-32.
107. Braun, M., et al., *Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(2): p. 395-401.
108. Faruqi, R.M. and P.E. DiCorleto, *Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation*. Br Heart J, 1993. **69**(1 Suppl): p. S19-29.
109. Ridker, P.M., et al., *Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men*. Lancet, 1998. **351**(9096): p. 88-92.
110. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
111. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
112. Hamilton, J.A., *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 533-44.

113. Hamilton, J.A., et al., *Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors*. J Cell Physiol, 1980. **103**(3): p. 435-45.
114. Nicola, N.A., *Hemopoietic cell growth factors and their receptors*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 45-77.
115. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
116. Lenzo, J.C., et al., *Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation*. Immunol Cell Biol. **90**(4): p. 429-40.
117. Liddiard, K., et al., *Macrophage heterogeneity and acute inflammation*. Eur J Immunol. **41**(9): p. 2503-8.
118. Qiao, J.H., et al., *Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice*. Am J Pathol, 1997. **150**(5): p. 1687-99.
119. Huh, H.Y., et al., *Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation*. Blood, 1996. **87**(5): p. 2020-2028.
120. Saitoh, T., et al., *Clinical significance of increased plasma concentration of macrophage colony-stimulating factor in patients with angina pectoris*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 655-65.
121. Finkelstein, A., et al., *Increased expression of macrophage colony-stimulating factor after coronary artery balloon injury is inhibited by intracoronary brachytherapy*. Circulation, 2002. **105**(20): p. 2411-5.
122. Sakai, M., et al., *Macrophage proliferation in atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2000. **11**(5): p. 503-9.
123. Shi, Y., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know*. Cell Res, 2006. **16**(2): p. 126-33.
124. Verreck, F.A., et al., *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4560-5.
125. Fleetwood, A.J., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 5245-52.
126. Gomez-Cambronero, J., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6846-55.
127. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
128. Salvayre, R., et al., *Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1585**(2-3): p. 213-21.
129. Libby, P., *Atheroma: more than mush*. Lancet, 1996. **348 Suppl 1**: p. s4-7.
130. Mallat, Z. and A. Tedgui, *[Apoptosis in the cardiovascular system]*. Ann Pathol, 1999. **19**(3): p. 265-73.
131. Tabas, I., *Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol*. Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 1**: p. S12-6.
132. Huang, W., M. Febbraio, and R.L. Silverstein, *CD9 tetraspanin interacts with CD36 on the surface of macrophages: a possible regulatory influence on uptake of oxidized low density lipoprotein*. PLoS One. **6**(12): p. e29092.
133. Li, J., et al., *Interferon-alpha priming promotes lipid uptake and macrophage-derived foam cell formation: a novel link between interferon-alpha and atherosclerosis in lupus*. Arthritis Rheum. **63**(2): p. 492-502.

134. Seimon, T. and I. Tabas, *Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S382-7.
135. Armengol, C., et al., *Role of scavenger receptors in the pathophysiology of chronic liver diseases*. Crit Rev Immunol, 2013. **33**(1): p. 57-96.
136. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.
137. Mukhopadhyay, S. and S. Gordon, *The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity*. Immunobiology, 2004. **209**(1-2): p. 39-49.
138. Hoebe, K., et al., *CD36 is a sensor of diacylglycerides*. Nature, 2005. **433**(7025): p. 523-7.
139. Shakushiro, K., et al., *Efficient scavenger receptor-mediated uptake and cross-presentation of negatively charged soluble antigens by dendritic cells*. Immunology, 2004. **112**(2): p. 211-8.
140. Pluddemann, A., C. Neyen, and S. Gordon, *Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands*. Methods, 2007. **43**(3): p. 207-17.
141. Rohrer, L., et al., *Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II*. Nature, 1990. **343**(6258): p. 570-2.
142. Matsumoto, A., et al., *Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9133-7.
143. Emi, M., et al., *Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 2120-5.
144. Sarrias, M.R., et al., *The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system*. Crit Rev Immunol, 2004. **24**(1): p. 1-37.
145. Lougheed, M., et al., *High affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I/II*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 12938-44.
146. Platt, N. and S. Gordon, *Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale*. J Clin Invest, 2001. **108**(5): p. 649-54.
147. Suzuki, H., et al., *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 292-6.
148. Sakaguchi, H., et al., *Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice*. Lab Invest, 1998. **78**(4): p. 423-34.
149. Naito, M., et al., *Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions*. Am J Pathol, 1992. **141**(3): p. 591-9.
150. Dunne, D.W., et al., *The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1863-7.
151. Yu, X., et al., *Pattern recognition scavenger receptor CD204 attenuates Toll-like receptor 4-induced NF-kappaB activation by directly inhibiting ubiquitination of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6*. J Biol Chem, 2011. **286**(21): p. 18795-806.
152. Haisma, H.J., et al., *Scavenger receptor A: a new route for adenovirus 5*. Mol Pharm, 2009. **6**(2): p. 366-74.
153. Thomas, C.A., et al., *Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 147-56.
154. Areschoug, T. and S. Gordon, *Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis*. Cell Microbiol, 2009. **11**(8): p. 1160-9.
155. Pluddemann, A., et al., *SR-A, MARCO and TLRs differentially recognise selected surface proteins from Neisseria meningitidis: an example of fine specificity in microbial ligand recognition by innate immune receptors*. J Innate Immun, 2009. **1**(2): p. 153-63.

156. Ozment, T.R., et al., *Scavenger receptor class a plays a central role in mediating mortality and the development of the pro-inflammatory phenotype in polymicrobial sepsis*. PLoS Pathog, 2012. **8**(10): p. e1002967.
157. Chen, Y., et al., *A regulatory role for macrophage class A scavenger receptors in TLR4-mediated LPS responses*. Eur J Immunol, 2010. **40**(5): p. 1451-60.
158. Levy-Barazany, H. and D. Frenkel, *Expression of scavenger receptor A on antigen presenting cells is important for CD4+ T-cells proliferation in EAE mouse model*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 120.
159. Nicoletti, A., et al., *The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation*. Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 512-21.
160. Silverstein, R.L. and M. Febbraio, *CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior*. Sci Signal, 2009. **2**(72): p. re3.
161. Tsuji, T. and T. Osawa, *Purification and chemical characterization of human platelet membrane glycoprotein IV*. J Biochem, 1986. **100**(4): p. 1077-85.
162. Asch, A.S., et al., *Isolation of the thrombospondin membrane receptor*. J Clin Invest, 1987. **79**(4): p. 1054-61.
163. Barnwell, J.W., et al., *A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Clin Invest, 1989. **84**(3): p. 765-72.
164. Ockenhouse, C.F., et al., *Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor*. Science, 1989. **243**(4897): p. 1469-71.
165. van Schravendijk, M.R., et al., *Normal human erythrocytes express CD36, an adhesion molecule of monocytes, platelets, and endothelial cells*. Blood, 1992. **80**(8): p. 2105-14.
166. Stary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(5): p. 840-56.
167. Tandon, N.N., U. Kralisz, and G.A. Jamieson, *Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7576-83.
168. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11811-6.
169. Collot-Teixeira, S., et al., *CD36 and macrophages in atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(3): p. 468-77.
170. Means, T.K., et al., *Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 637-53.
171. Stuart, L.M., et al., *Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain*. J Cell Biol, 2005. **170**(3): p. 477-85.
172. Jimenez-Dalmaroni, M.J., et al., *Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2*. PLoS ONE, 2009. **4**(10): p. e7411.
173. Triantafilou, M., et al., *Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 31002-11.
174. Abumrad, N.A., et al., *Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36*. J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 17665-8.
175. Ibrahimi, A., et al., *Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26761-6.
176. Febbraio, M., et al., *A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 19055-62.
177. He, J., et al., *The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(10): p. 1116-21.

178. Silverstein, R.L., *Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: Role of the scavenger receptor CD36*. Cleveland Clinic Journal of Medicine, 2009. **76**(Suppl 2): p. S27-S30.
179. Nozaki, S., et al., *Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1859-65.
180. Febbraio, M., et al., *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1049-56.
181. Nakata, A., et al., *CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1333-9.
182. Acton, S.L., et al., *Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21003-9.
183. Calvo, D. and M.A. Vega, *Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMP-II gene family*. J Biol Chem, 1993. **268**(25): p. 18929-35.
184. Swarnakar, S., et al., *Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 29733-9.
185. Stangl, H., M. Hyatt, and H.H. Hobbs, *Transport of Lipids from High and Low Density Lipoproteins via Scavenger Receptor-BI*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(46): p. 32692-32698.
186. Stephen, S.L., et al., *Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease*. Int J Hypertens. **2010**: p. 646929.
187. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
188. Gronemeyer, H., J.A. Gustafsson, and V. Laudet, *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(11): p. 950-64.
189. Fleischhauer, K., et al., *Isolation of a full-length cDNA clone encoding a N-terminally variant form of the human retinoid X receptor beta*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(7): p. 1801.
190. Hamada, K., et al., *H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(21): p. 8289-93.
191. Dolle, P., et al., *Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes*. Mech Dev, 1994. **45**(2): p. 91-104.
192. Mangelsdorf, D.J., et al., *A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR*. Cell, 1991. **66**(3): p. 555-61.
193. Ricote, M., A.F. Valledor, and C.K. Glass, *Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. 230-9.
194. Ricote, M., et al., *Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7614-9.
195. Nagy, L., et al., *Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma*. Cell, 1998. **93**(2): p. 229-40.
196. Li, A.C., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. J Clin Invest, 2000. **106**(4): p. 523-31.
197. Smith, D.D., et al., *Increased aortic atherosclerotic plaque development in female apolipoprotein E-null mice is associated with elevated thromboxane A2 and decreased prostacyclin production*. J Physiol Pharmacol. **61**(3): p. 309-16.
198. Moore, K.J., et al., *The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 41-7.
199. Chawla, A., et al., *A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis*. Mol Cell, 2001. **7**(1): p. 161-71.

200. Chinetti, G., et al., *PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway*. *Nat Med*, 2001. **7**(1): p. 53-8.
201. Repa, J.J. and D.J. Mangelsdorf, *The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. **16**: p. 459-81.
202. Repa, J.J., et al., *Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta*. *Genes Dev*, 2000. **14**(22): p. 2819-30.
203. Peng, D., et al., *Antiatherosclerotic effects of a novel synthetic tissue-selective steroidal liver X receptor agonist in low-density lipoprotein receptor-deficient mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **327**(2): p. 332-42.
204. Schultz, J.R., et al., *Role of LXRs in control of lipogenesis*. *Genes Dev*, 2000. **14**(22): p. 2831-8.
205. Collins, J.L., et al., *Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines*. *J Med Chem*, 2002. **45**(10): p. 1963-6.
206. Sodhi, R.K. and N. Singh, *Liver X receptors: Emerging therapeutic targets for Alzheimer's disease*. *Pharmacol Res*, 2013. **72**: p. 45-51.
207. Laffitte, B.A., et al., *Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5419-24.
208. Valledor, A.F. and M. Ricote, *Nuclear receptor signaling in macrophages*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **67**(2): p. 201-12.
209. Tangirala, R.K., et al., *Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(18): p. 11896-901.
210. 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.
211. Haghpassand, M., et al., *Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(9): p. 1315-20.
212. Brunzell, J.D., et al., *Apoproteins B and A-I and coronary artery disease in humans*. *Arteriosclerosis*, 1984. **4**(2): p. 79-83.
213. Maciejko, J.J., et al., *Apolipoprotein A-I as a marker of angiographically assessed coronary-artery disease*. *N Engl J Med*, 1983. **309**(7): p. 385-9.
214. 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.
215. Kennedy, M.A., et al., *ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation*. *Cell Metab*, 2005. **1**(2): p. 121-31.
216. Ito, T., *Physiological function of ABCG1*. *Drug News Perspect*, 2003. **16**(8): p. 490-2.
217. de la Llera-Moya, M., et al., *Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface*. *J Lipid Res*, 1999. **40**(3): p. 575-80.
218. Rader, D.J., *Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(12): p. 3090-100.
219. Joseph, S.B., et al., *Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors*. *Nat Med*, 2003. **9**(2): p. 213-9.
220. Welch, J.S., et al., *PPARGamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(11): p. 6712-7.
221. Tontonoz, P., et al., *PPARGamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 241-52.
222. Castrillo, A., et al., *Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(12): p. 10443-9.
223. 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.

224. 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.
225. Ranger, A.M., B.A. Malynn, and S.J. Korsmeyer, *Mouse models of cell death*. Nat Genet, 2001. **28**(2): p. 113-8.
226. Maier, J.K., et al., *The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7*. J Neurosci, 2002. **22**(6): p. 2035-43.
227. Villedor, A.F., et al., *Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(51): p. 17813-8.
228. Joseph, S.B., et al., *LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response*. Cell, 2004. **119**(2): p. 299-309.
229. Miyazaki, T., J. Kurokawa, and S. Arai, *AIMing at metabolic syndrome. -Towards the development of novel therapies for metabolic diseases via apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)*. Circ J. **75**(11): p. 2522-31.
230. Aruffo, A., et al., *CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function?* Immunol Today, 1997. **18**(10): p. 498-504.
231. Gebe, J.A., et al., *Molecular cloning, mapping to human chromosome 1 q21-q23, and cell binding characteristics of Spalpha, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6151-8.
232. Gebe, J.A., et al., *Molecular cloning, genomic organization and cell-binding characteristics of mouse Spalpha*. Immunology, 2000. **99**(1): p. 78-86.
233. Sarrias, M.R., et al., *Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpha*. Tissue Antigens, 2004. **63**(4): p. 335-44.
234. Mori, M., et al., *Modification of N-glycosylation modulates the secretion and lipolytic function of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM)*. FEBS Lett. **586**(20): p. 3569-74.
235. Arai, S., et al., *A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Ap16 in atherosclerosis development*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 201-13.
236. Zou, T., et al., *Listeria monocytogenes infection induces prosurvival metabolic signaling in macrophages*. Infect Immun. **79**(4): p. 1526-35.
237. Im, S.S. and T.F. Osborne, *Protection from bacterial-toxin-induced apoptosis in macrophages requires the lipogenic transcription factor sterol regulatory element binding protein 1a*. Mol Cell Biol. **32**(12): p. 2196-202.
238. Miyazaki, T., et al., *Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 413-22.
239. Haruta, I., et al., *Association of AIM, a novel apoptosis inhibitory factor, with hepatitis via supporting macrophage survival and enhancing phagocytotic function of macrophages*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22910-4.
240. Kurokawa, J., et al., *Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity*. Cell Metab. **11**(6): p. 479-92.
241. Tissot, J.D., et al., *IgM are associated to Sp alpha (CD5 antigen-like)*. Electrophoresis, 2002. **23**(7-8): p. 1203-6.
242. Gangadharan, B., et al., *Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients*. Clin Chem, 2007. **53**(10): p. 1792-9.
243. Gray, J., et al., *A proteomic strategy to identify novel serum biomarkers for liver cirrhosis and hepatocellular cancer in individuals with fatty liver disease*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 271.
244. Kim, W.K., et al., *Glycoproteomic analysis of plasma from patients with atopic dermatitis: CD5L and ApoE as potential biomarkers*. Exp Mol Med, 2008. **40**(6): p. 677-85.
245. Yu, H.R., et al., *A unique plasma proteomic profiling with imbalanced fibrinogen cascade in patients with Kawasaki disease*. Pediatr Allergy Immunol, 2009.
246. Sarrias, M.R., et al., *A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35391-8.

247. Kojima, J., et al., *Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression in alveolar macrophages in COPD*. *Respir Res*, 2013. **14**: p. 30.
248. Aguilera, C.M., et al., *Monounsaturated and omega-3 but not omega-6 polyunsaturated fatty acids improve hepatic fibrosis in hypercholesterolemic rabbits*. *Nutrition*, 2005. **21**(3): p. 363-71.
249. Wu, X., et al., *Localized vessel expression of lipoprotein lipase in rabbits leads to rapid lipid deposition in the balloon-injured arterial wall*. *Atherosclerosis*, 2006. **187**(1): p. 65-73.
250. Noa, M., R. Mas, and C. Lariot, *Protective effect of policosanol on endothelium and intimal thickness induced by forceps in rabbits*. *J Med Food*, 2007. **10**(3): p. 452-9.
251. West, K.L. and M.L. Fernandez, *Guinea pigs as models to study the hypocholesterolemic effects of drugs*. *Cardiovasc Drug Rev*, 2004. **22**(1): p. 55-70.
252. Himmelfarb, J., *Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg?* *Semin Dial*, 2004. **17**(6): p. 449-54.
253. Paigen, B., et al., *Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H*. *Atherosclerosis*, 1987. **64**(2-3): p. 215-21.
254. Ishibashi, S., et al., *The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(10): p. 4431-5.
255. Piedrahita, J.A., et al., *Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4471-5.
256. Paigen, B., et al., *Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice*. *Atherosclerosis*, 1987. **68**(3): p. 231-40.
257. Forgez, P., et al., *The lipid transport system in the mouse, *Mus musculus*: isolation and characterization of apolipoproteins B, A-I, A-II, and C-III*. *J Lipid Res*, 1984. **25**(9): p. 954-66.
258. Wada, Y., et al., *In vitro model of atherosclerosis using coculture of arterial wall cells and macrophage*. *Yonsei Med J*, 2000. **41**(6): p. 740-55.
259. Qin, Z., *The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature*. *Atherosclerosis*. **221**(1): p. 2-11.
260. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. *Int J Cancer*, 1980. **26**(2): p. 171-6.
261. Tsuchiya, S., et al., *Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester*. *Cancer Res*, 1982. **42**(4): p. 1530-6.
262. Schwende, H., et al., *Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3*. *J Leukoc Biol*, 1996. **59**(4): p. 555-561.
263. Johnson, A.C., et al., *Experimental glomerulopathy alters renal cortical cholesterol, SR-B1, ABCA1, and HMG CoA reductase expression*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(1): p. 283-91.
264. Kohro, T., et al., *A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage*. *J Atheroscler Thromb*, 2004. **11**(2): p. 88-97.
265. Naranjo-Gomez, M., et al., *Primary alloproliferative TH1 response induced by immature plasmacytoid dendritic cells in collaboration with myeloid DCs*. *Am J Transplant*, 2005. **5**(12): p. 2838-48.
266. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. *J Clin Invest*, 1955. **34**(9): p. 1345-53.
267. Ziouzenkova, O., et al., *Copper can promote oxidation of LDL by markedly different mechanisms*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **24**(4): p. 607-23.
268. Basu, S.K., et al., *Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(9): p. 3178-82.

269. Paigen, B., M.B. Havens, and A. Morrow, *Effect of 3-methylcholanthrene on the development of aortic lesions in mice*. *Cancer Res*, 1985. **45**(8): p. 3850-5.
270. Alzamora, M.T., et al., *Peripheral Arterial Disease study (PERART): prevalence and predictive values of asymptomatic peripheral arterial occlusive disease related to cardiovascular morbidity and mortality*. *BMC Public Health*, 2007. **7**: p. 348.
271. Kritharides, L., et al., *Cholesterol metabolism and efflux in human THP-1 macrophages*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(10): p. 1589-99.
272. Tabas, I., *Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1529**(1-3): p. 164-74.
273. Xu, M., et al., *ABCG1 mediated oxidized LDL-derived oxysterol efflux from macrophages*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **390**(4): p. 1349-54.
274. Hayden, J.M., et al., *Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol*. *J. Lipid Res.*, 2002. **43**(1): p. 26-35.
275. Han, J., et al., *Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(34): p. 21654-9.
276. !!! INVALID CITATION !!!
277. Elomaa, O., et al., *Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages*. *Cell*, 1995. **80**(4): p. 603-9.
278. Sarrias, M.R., et al., *CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(28): p. 11724-9.
279. Bentzon, J.F. and E. Falk, *Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease?* *Curr Opin Lipidol*, 2010. **21**(5): p. 434-40.
280. Ohayon, J., et al., *Elucidating atherosclerotic vulnerable plaque rupture by modeling cross substitution of ApoE^{-/-} mouse and human plaque components stiffnesses*. *Biomech Model Mechanobiol*, 2012. **11**(6): p. 801-13.
281. Fukuchi, J., et al., *Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2004. **64**(21): p. 7686-9.
282. Koonen, D.P., et al., *Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity*. *Diabetes*, 2007. **56**(12): p. 2863-71.
283. Ishigaki, Y., et al., *Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis*. *Circulation*, 2008. **118**(1): p. 75-83.
284. Jalkanen, J., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted decoy human macrophage scavenger receptor (SR-AI) in LDL receptor knock-out mice*. *Atherosclerosis*, 2003. **169**(1): p. 95-103.
285. Zhang, L., et al., *Lentiviral vector-mediated siRNA knockdown of SR-PSOX inhibits foam cell formation in vitro*. *Acta Pharmacol Sin*, 2008. **29**(7): p. 847-52.
286. Scazzocchio, B., et al., *Oxidized LDL impair adipocyte response to insulin by activating serine/threonine kinases*. *J Lipid Res*, 2009. **50**(5): p. 832-45.
287. Matsuura, E., G.R. Hughes, and M.A. Khamashta, *Oxidation of LDL and its clinical implication*. *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(7): p. 558-66.
288. Lourida, E.S., et al., *Patients with early rheumatoid arthritis exhibit elevated autoantibody titers against mildly oxidized low-density lipoprotein and exhibit decreased activity of the lipoprotein-associated phospholipase A2*. *Arthritis Res Ther*, 2007. **9**(1): p. R19.